N° D'ORDRE :
ANNEE 1966

THÈSES

Présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE

Pour Obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

Par

Marie-Claire PASCAL

PREMIERE THESE

Contribution à l'étude du métabolisme des acides D- et L-lactiques chez les bactéries anaérobies facultatives

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 1966 devant la Commission d'examen

MM. P. DESNUELLE Président

R. MONIER
J. RICARD
J. SENEZ
} Examinateurs

N° D'ORDRE :
ANNEE 1966

THÈSES

Présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE

Pour Obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

Par

Marie-Claire PASCAL

PREMIERE THESE

Contribution à l'étude du métabolisme des acides D- et L-lactiques chez les bactéries anaérobies facultatives

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 1966 devant la Commission d'examen

MM. P. DESNUELLE Président

R. MONIER
J. RICARD
J. SENEZ
} Examinateurs

FACULTÉ DES SCIENCES – UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE

. Mort au Champ d'Honneur, M. F. MARTY
Maître de conférences de Mathématiques.
(14 juin 1940)

Doyens honoraires

MM. MARCHAUD, TRAYNARD, CORROY, CHOUX

Professeurs honoraires

MM. J. MARCHAUD, E. TRAYNARD, C. PETIT, R. THIRY, J. BOSLER, A. TIAN, L. MARGAILLAN, P. BENOIT, H. CABANNES, P. CHOUX, G. LIANDRAT, R. CERIGHELLI, C. CORROY, E. CALVET, L. ROYER.

Doyen

M. P. ROUARD

Assesseurs

MM. A. GUILLEMONAT, J.M. PERES

Secrétaire principal honoraire :

M. H. LANFRANCHI

Conseiller, chef des services administratifs

M. C. MOYNAULT

PROFESSEURS

MM.	J. VALENSI	Mécanique expérimentale des fluides	P. BOUSQUET	Physique S.P.C.N.
	P. ROUARD	Physique générale	P. PESTEIL	Physique C.P.E.M.
	H. PRAT	Botanique	P. CASAL	Mécanique rationelle et appliqué
	P. DESNUELLE	Chimie biologique	C. GOUVERNET	Géologie appliquée
	M. ABELOOS	Biologie générale	A. VISCONTI	Physique théorique
	R. MERIGOUX	Physique industrielle	A. BLANCHARD	Mathématiques générales
	P. VINCENSINI	Calcul différentiel et intégral	M. DUSSARDIER	Physiologie animale
	C. FEHRENBACH	Astronomie	M. PEMROT	Physique
	A. FAVRE	Mécanique de l'atmosphère et météorologie	P. QUEZEL	Botanique
	A. GUILLEMONAT	Chimie industrielle	E. CRAUSSE	Physique (Avignon)
	J.N. PERES	Océanographie biologique	A. JULG	Chimie théorique
	G. CARPENI	Chimie M.P.C.	S. TAXY (Mme)	Géologie historique
	C. JAUSSERAN	Physique expérimentale	R. MONIER	Chimie biologique
	R. MOLINIER	Biologie végétale	M.L. FURNESTIN (Mme)	Biologie animale S.P.C.N.
	Y. DOUCET	Physique M.P.C.	M. BERTRAND	Chimie S.P.C.N.
	J.M. SOURIAU	Méthodes mathématiques de la physique	J. THOMPETTE	Physique S.P.C.N.
	P. COTTON	Electronique	A. ARAGNOL	Mathématiques
	J. METZGER	Chimie S.P.C.N.	M. LAFFITTE	Chimie M.P.C.
	J. TIMON-DAVID	Zoologie	R. FRAISSE	Mathématiques
	L. FOURES	Mathématiques	C. BLANCHARD (Mme)	Mathématiques
	D. MALE	Physique	R. NEGRE	Biologie végétale
	G. BODIOU	Mathématiques appliquées	A. PENELOUX	Chimie
	M. NAUDET	Chimie des corps gras	R. BUVAT	Cytologie et biologie végétale
	J. PAILLARD	Psycho-physiologie	R. COULON	Physique
	L. SAVIDAN	Chimie systématique	M. MOREL	Analyse munérique
	D. KASTLER	Physique théorique		

PROFESSEURS SANS CHAIRE

C. CLARION (Mlle)	Mécanique des fluides	R. PHILIP	Physique
R. AMAR	Biologie animale S.P.C.N.	M. BIZOUARD	Physique
J. CHOUTEAU	Physiologie animale	H. GUENOCHE	Mathématiques appliquées
L. DEVEZE	Biologie marine	J. RICARD	Botanique
H. CHANTREL	Physique de l'espace	J.M. SURZUR	Chimie organique
L. SIDERIADES	Dynamique des vibrations	J.P. DAVID	Physique
J. MANDELBROJT	Physique nucléaire	H. BODOT	Chimie
F. BOREL	Techniques mathématiques de la physique	J.C. TRAYNARD	Chimie industrielle
J. BLANC	Géologie marine	G. DUCET	Agronomie tropicale
R. CHANDEBOIS (Mlle)	Biologie animale	F. TISON (Mme)	Mathématiques (Avignon)
A. BOURDILLON	Biologie animale		

MAITRES DE CONFERENCES

MOLINIER Roger	Biologie végétale	G. RASIGNI	Physique
H. PATIN	Chimie M.P.C.	H. BACRY	Physique théorique
J. HENNEQUIN	Electronique	G. LAPLUYE	Chimie (C.E.S.S. La Réunion)
L. CAPELLA	Minéralogie	L. CARBONNEL (Mme)	Chimie (Avignon)
S. COMBET	Chimie	R. GARRON	Physique expérimentale
M. ZERNER	Mathématiques M.P.C.	J. BOULON	Astronomie
J.C. MAIRE	Chimie C.P.E.M.	M. PICHENOT (Mlle)	Biologie végétale
Y. POIRIER	Physique (Avignon)	M. SIMON	Physiologie animale
L. LAGARDE (Mlle)	Chimie générale	M. CADILHAC	Physique
S. GUEIRARD (Mlle)	Pétrographie	A. PONS	Biologie végétale
C. FEUGEAS	Chimie	N. EGO	Mathématiques (C.E.S.S. La Réun
J. CABANEL	Chimie	G. MARCHIS-MOUREN	Chimie biologique

CHARGES DE CONFERENCES

J. MORIN	Neurophysiologie	N. BOURG	Physique C.P.E.M.
H. GAVINI (Mlle)	Psycho-physiologie	A. ROBILLARD	Chimie
P. JEAN	Physique	J. GONELLA	Physique
J.C. SENEZ	Chimie biologique	PEIFFER	Chimie
M. COTTON (Mme)	Mathématiques	J. VALLIER	Physique
H. GASTAUD	Neurophysiologie	P. BOIVINET	Chimie
D. SCHACHTER (Mme)	Ecologie terrestre et limnique	R. DUMAS	Mathématiques
L. CASSAND	Physiologie animale	N. BENARROCHE	Physique
L. GARNIER	Physiologie animale	L. SARDA	Chimie biologique
A. GILET	Mathématiques	M. LADZUNSKI	Chimie biologique
J. HALADJIAN	Chimie M.P.C.	J.P. ROGGERO	Chimie
J. CARMONA	Mathématiques M.P.C.	J. CRESP	Biologie animale

A la mémoire de ma Mère

A mon Père

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Cette étude a été réalisée dans le Laboratoire de Chimie Bactérienne du C. N. R. S., sous la direction de Monsieur Jacques C. Senez, qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire. C'est à lui que je dois l'essentiel de ma formation scientifique. Je suis heureuse de pouvoir lui exprimer ici ma profonde gratitude.

Je tiens à exprimer ma sincère reconnaissance à Monsieur Francis Pichinoty, Maître de Recherches au C. N. R. S. qui m'a guidée et conseillée pendant la réalisation de ce travail.

Je remercie Monsieur le Professeur Desnuelle qui a bien voulu juger cette Thèse. Je remercie également Messieurs les Professeurs Monier et Ricard d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

Je tiens à remercier tous mes camarades du Laboratoire pour l'amitié qu'ils m'ont témoignée pendant ces années de travail.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545823_0041

SOMMAIRE

INTRODUCTION

1- Le métabolisme de l'acide lactique chez les bactéries 1
2- Les lactate-déshydrogénases de la levure 6
3- Régulation des lactate-déshydrogénases chez les micro-organismes .. 8
a) Saccharomyces cerevisiae 8
b) Bactéries 11

Chapitre I : MATERIEL ET METHODES

1- Organismes 15
2- Milieux et conditions de culture 15
3- Mesure de croissance 16
4- Préparation des extraits 16
5- Préparation des solutions de D- et de L-lactate 16
6- Mesure des activités lactate-déshydrogénases 17
a) Mesure d'activité en présence de DCIP..... 17
b) Mesure d'activité en présence de PMS 19
7- Mesure des activités lactate-cytochrome c-réductases..... 20
8- Mesure de l'activité pyruvate-réductase 20
9- Méthodes analytiques 20
a) Identification des antipodes optiques du lactate 20
b) Dosages 21

Chapitre II ; MISE EN EVIDENCE ET PROPRIETES DE LA D- ET DE LA L-LACTATE-DESHYDROGENASE D'AEROBACTER AEROGENES

1- Croissance sur lactate et activités des cellules entières 23
2- Activité respiratoire des extraits bruts 23
3- Recherche d'une racémisation de l'acide lactique 24
4 - Accepteurs d'électrons 26
5- Spécificité de substrats 27
6- Influence de la concentration en substrats sur les activités lactate-déshydrogénases 27
7- Inhibiteurs 27
8- Centrifugation fractionnée des extraits 30
9- Identification du groupement posthétique de la L-LDH 30
10-Irréversibilité des deux lactate-déshydrogénases 31
11-Discussion 33

Chapitre III : LA PYRUVATE-REDUCTASE A PYRIDINE-NUCLEOTIDE D'AEROBACTER AEROGENES

1- Accumulation de D-lactate dans les cultures 37
2- Réduction du pyruvate par les extraits bruts 38
3- Purification 43
4- Cause de l'irréversibilité apparente 47
5- Discussion 51

Chapitre IV : REGULATION DES D- ET L- LACTATE-DESHYDROGENASES ET DE LA PYRUVATE-REDUCTASE D'AEROBACTER AEROGENES

1- Pyruvate-réductase 53
2- D- et L-lactate-déshydrogénases 53
a) Formation des deux enzymes dans les cellules cultivées sur lactate en aérobiose 53
b) Formation des enzymes dans les cultures aérobies sur glucose seul 57
c) Effet du glucose sur la synthèse et l'activité des LDH 57
d) Influence d'autres substrats carbonés sur la synthèse des LDH 62
e) Influence de l'oxygène sur la biosynthèse de la L-LDH 65
3- Discussion 72

Chapitre V : LACTATE-DESHYDROGENASES ET PYRUVATE-REDUCTASE D'AUTRES BACTERIES

1- Entérobactéries 77
2- Micrococcus denitrificans 78

CONCLUSIONS 87

BIBLIOGRAPHIE 93

INTRODUCTION

1- LE METABOLISME DE L'ACIDE LACTIQUE CHEZ LES BACTERIES

L'acide lactique occupe une place importante dans le métabolisme des bactéries en général. Il est en effet dégradé par de nombreux organismes qui utilisent le lactate, soit en aérobiose, soit en anaérobiose, comme seule source de carbone et d'énergie. D'autre part, il est formé, en quantités parfois extrêmement abondantes, et même comme seul produit métabolique, au cours de la fermentation des glucides, par une grande variété de bactéries anaérobies strictes ou facultatives.

Parmi les bactéries capables de se développer sur lactate en aérobiose, figurent notamment les Enterobacteriacae qui seront plus particulièrement étudiées au cours du présent travail, la plupart des Pseudomonas, les membres du genre Acetobacter, et certains Azotobacter. En anaérobiose, le lactate est fermenté par les bactéries butyriques (Butyribacterium) et par les bactéries propioniques qui comprennent, en dehors du genre Propionibacterium, Veillonella gazogenes et Clostridium propionium. D'autre part, le lactate est fermenté en acétate et CO_2 par les bactéries sulfato réductrices (Desulfovibrio desulfuricans).

Le lactate est le produit sinon unique du moins largement prédominant de la fermentation des glucides par les bactéries "homo lactiques", c'est-à-dire par les membres des genres Streptococcus et Pediococcus et par de nombreuses espèces de Lactobacillus. Il est formé, conjointement à d'autres acides organiques et produits métaboliques, par les bactéries "hétérolactiques" (genre Leuconostoc, et plusieurs Lactobacillus), par les Clostridies, et par les bactéries anaérobies facultatives réalisant le mode de fermentation dit "acide mixte" (Entérobactéries, Bacillus subtilis, etc...).

Les enzymes responsables de la dégradation ou de la formation du lactate par ces divers organismes n'ont pas tous été étudiés ni même identifiés. Il est cependant établi qu'il existe, chez les bactéries, deux types principaux de lactate-déshydrogénases (LDH).

Un premier groupe est constitué par des enzymes à pyridine-nucléotides analogues à la lactate-déshydrogénase des mammifères. Dans tous les cas où il a été identifié, le coenzyme de ces déshydrogénases bactériennes s'est révélé être le NAD. D'autre part, ces enzymes sont, en règle générale, solubles.

Il convient de souligner que le potentiel standard d'oxydoréduction du couple lactate-pyruvate est sensiblement moins électronégatif que celui du système NAD oxydé - NAD réduit. Dans les conditions physiologiques, c'est-à-dire à pH neutre, ces potentiels revêtent les valeurs suivantes :

$$\text{pyruvate} \rightleftharpoons \text{lactate} + 2H^+ + 2e \qquad E'_o = -0,180 \text{ Volt}$$

$$\text{NADH} \rightleftharpoons NAD^+ + H^+ + 2e \qquad E'_o = -0,320 \text{ Volt}$$

Comme on le verra de façon plus détaillée dans un chapitre ultérieur de ce travail, il en résulte que les LDH à pyridine-nucléotides, ont essentiellement pour fonction la réduction du pyruvate en lactate, c'est-à-dire une activité pyruvate-réductase, et ne participent pas physiologiquement au processus inverse, c'est-à-dire à la dégradation oxydative du lactate.

Cette dernière fonction est assurée par le second type de LDH, enzymes qui ne sont pas couplés aux pyridine-nucléotides, et dont le coenzyme, lorsqu'il a pu être caractérisé, s'est révélé être une flavine, en général le FMN. Le potentiel standard d'oxydoréduction des flavines (E'_o = -0,180 V) est identique à celui du couple lactate-pyruvate.

L'étude et la purification des LDH Flavoprotéiques sont rendues difficiles par la nature le plus souvent particulaire de ces enzymes. De ce fait, on ne possède encore qu'un petit nombre de données expérimentales sur leur structure et sur leurs relations avec la chaîne respiratoire. A ce dernier égard, il convient cependant de souligner qu'on n'avait pas signalé jusqu'ici de LDH bactérienne couplée au cytochrome c, comme c'est le cas pour deux des LDH de la levure. On verra qu'un tel couplage a pu être mis en évidence chez l'un des microorganismes étudiés au cours du présent travail (Micrococcus denitrificans).

Un autre problème général concernant les LDH bactériennes est leur stéréospécificité. Il est établi depuis longtemps que le lactate formé par les micro-organismes est, suivant la bactérie considérée, soit le D-lactate, soir le L-lactate, soit enfin un mélange racémique des deux antipodes optiques (Tableau I). On a, de ce fait, été amené à se demander si, dans le dernier cas, le mélange de D- et de L-lactate est produit par une LDH non stéréospécifique, par deux enzymes stéréospécifiques distincts, ou enfin par un enzyme stéréospécifique associé à une racémase. Le même problème se pose évidemment pour les organismes qui oxydent le lactate.

Chez les bactéries qui produisent ou qui métabolisent le DL-lactate on n'a jamais mis en évidence d'enzyme non stéréospécifique, c'est-à-dire d'enzyme unique qui serait capable de déshydrogéner indifféremment le D- et le L-lactate. Par contre, on a démontré la coexistence de deux ou de plusieurs LDH stéréospécifiques dans la quasi totalité des cas où ces enzymes ont été recherchés

C'est ainsi qu'à partir de Lactobacillus plantarum, bactérie homolactique qui accumule du DL-lactate au cours de la fermentation du glucose, Dennis et Kaplan (1960) ont isolé et purifié une D-LDH et une L-LDH, toutes deux couplées au NAD et réversibles. Ces auteurs ont souligné que l'association fonctionnelle des deux enzymes est susceptible d'assurer la racémisation homogène du lactate par l'intermédiaire du pyruvate :

TABLEAU I

CONFIGURATION DE L'ACIDE LACTIQUE PRODUIT
PAR DIVERS MICRO-ORGANISMES

Organismes	Configuration	Références
Streptococcus sp	L(+)	a
Lactobacillus caucasicus, L. lactis	D(-)	
Lactobacillus leichmanii	D(-)	a, b
Lactobacillus helveticus, L. bifidus	DL	c
Lactobacillus plantarum	DL	c
Lactobacillus thermophilis, L. delbrueckii	L(+)	d, e
Lactobacillus bulgaricus	DL ou D(-)	b
Lactobacillus casei	L(+) et D(-)	e
Pediococcus sp.	DL	f
Bacillus sp.	L(+)	g
Clostridium sp.	DL	h, i
Butyribacterium rettgeri	DL	j
Lactobacillus brevis, L. buchneri pasteurianus, L. fermenti	DL	a
Leuconostoc sp.	D(-)	a
Microbacterium sp.	L(+)	k
Rhizopus sp.	L(+)	b
Serratia sp.	D(-)	l

a : Breed et coll. (1948) ; b: Brin et coll. (1952); c : Pederson (1929) ;

d : Fred et coll. (1925) ; e : Tatum et Peterson (1935) ; f: Pederson (1949) ;

g : Anderson et Greaves (1942) ; h: Osburn et coll. (1937) ; i: Simon (1947) ;

j : Pine et coll. (1954) ; k : Orla-Jensen (1919) ; l : Pederson et Bred (1929).

$$\text{D-lactate} \underset{+2H}{\overset{-2H}{\rightleftharpoons}} \text{pyruvate} \underset{-2H}{\overset{+2H}{\rightleftharpoons}} \text{L-lactate}$$

Chez le même organisme, Snoswell (1963) a d'autre part mis en évidence et séparé deux autres LDH stéréospécifiques, indépendantes des pyridines-nucléotides et de nature flavoprotéique.

La multiplicité des LDH et en particulier des enzymes oxydatifs flaviniques est une éventualité fréquente. A ce sujet, il convient de souligner que la liste des enzymes figurant sur le Tableau II n'est pas exhaustive et il est possible que certains des organismes énumérés possèdent d'autres LDH en dehors de ceux qui ont déjà été mis en évidence. Ce cas est notamment celui d'Escherichia colichez qui on a constaté, au cours du présent travail, l'existence d'une pyruvate-réductase à NAD en plus des deux LDH flaviniques qui étaient antérieurement connues.

La possession simultanée de deux LDH stéréospécifiques peut assurer indirectement la racémisation du lactate, mais n'exclut pas la possibilité que les organismes considérés possèdent aussi une racémase. L'existence, chez les bactéries, d'enzymes racémisant le lactate a été longtemps envisagée sans preuve expérimentale décisive. Ce problème s'est posé de façon particulièrement explicite dans le cas de Clostridium butylicum. Le fait que les suspensions non proliférantes et les extraits de cet organisme sont capables d'intervertir les deux antipodes optiques de l'acide lactique a d'abord été signalé par Christensen et coll. (1939) On s'est demandé si cette activité est assurée par une racémase proprement dite ou bien, comme chez L. plantarum, par l'association de LDH stéréospécifiques. La question ainsi posée a été résolue par Dennis et Kaplan (1963) qui ont isolé et purifié à partir de C. butylicum une fraction protéique catalysant l'interconversion des deux isomères du lactate, mais incapable d'oxyder l'acide lactique en pyruvate et de réaliser la réaction inverse. Il serait intéressant de savoir si, en dehors de cette racémase, C. butylicum possède une ou plusieurs LDH stéréospécifiques, mais on ne possède encore aucune information précise à ce sujet.

Il convient de souligner que les LDH flavoprotéiques dont il a été question dans les pages précédentes ne sont pas les seuls enzymes bactériens pouvant assurer la dégradation oxydative de l'acide lactique. Chez Mycobacterium avium, Yamamura et coll. (1952) ont décrit deux lactate-oxydases distinctes dont une produit du pyruvate et se comporte comme une LDH :

$$CH_3\text{-}CHOH\text{-}COOH + 1/2\ O_2 \longrightarrow CH_3\text{-}CO\text{-}COOH + H_2O$$

tandis que l'autre conduit à l'acétate et au CO_2 :

$$CH_3\text{-}CHOH\text{-}COOH + O_2 \longrightarrow CH_3\text{-}COOH + CO_2 + H_2O$$

TABLEAU II

LACTATE-DESHYDROGENASES BACTERIENNES DONT LA STEREOSPECIFICITE A ETE ETABLIE

Organismes	Stéréospécificité		Références
	enzymes à NAD	enzymes flaviniques	
Lactobacillus plantarum	D et L		Dennis et Kaplan (1960)
		D et L	Snoswell (1963)
Leuconostoc mesenteroides	D		Tabeke (1963)
		D	Kaufmann et Dikstein (1961)
Bacillus subtilis	L		Yoshida (1965)
Escherichia coli	(D)	D et L	Klyne et Mahler (1965)
Acetobacter peroxydans		D et L	De Ley et Schel (1959)
Pseudomonas natriegens		D et L	Walker et Eagon (1964)
Propionibacterium pentosaceum		D	Molinari et Lara (1960)

Nota : l'enzyme entre parenthèses (E. coli) a été mis en évidence au cours du présent travail.

Ces auteurs n'ont pas précisé la stéréospécificité de ces enzymes, ni établi si la deuxième réaction consiste dans un processus direct de décarboxylation oxydative. Cependant, chez une autre Mycobactérie (M. phlei), Sutter (1957) a mis en évidence et cristalisé un enzyme qui réalise directement la seconde des réactions précédentes et qui est spécifique pour le L-lactate (L-lactate - oxydase). Cette étude démontre de façon concluante qu'une seule et même protéine assure à la fois l'oxydation et la décarboxylation du substrat. Nous n'avons pas relevé, dans la littérature, de lactate-décarboxylase ailleurs que chez les Mycobactéries.

2- LES LACTATE-DESHYDROGENASES DE LA LEVURE

Les LDH de Saccharomyces cerevisiae ont été étudiées de façon beaucoup plus détaillée que celles des bactéries. La première qui ait été mise en évidence et purifiée est spécifique pour le L-lactate et utilise comme accepteur d'électrons, le cytochrome c de mammifère (Bach et coll., 1946), d'où sa dénomination de L-lactate-cytochrome c-réductase (L-LCR). Cet enzyme, appelé aussi cytochrome b_2, a été obtenu à l'état cristalisé Appleby et Morton, 1954) ; il s'agit d'une flavo-hémoprotéine, contenant, pour une mole de FMN, une mole de protohème (Appleby et Morton 1959). Cette L-LCR ne contient pas de fer non héminique ni d'autre métal et son activité est insensible aux agents complexants. Elle a une spécificité de substrat assez étroite et, en dehors du L-lactate, elle n'oxyde que le L-α-hydroxybutyrate (Appleby et Morton, 1959). Par contre elle est active avec une grande variété d'accepteurs comprenant, outre le cytochrome c, le 2,6-dichlorophénol-indophénol (DCIP), le phénazine-méthosulfate (PMS), le ferricyanure et le bleu de méthylène (Appleby et Morton, 1954).

Okunuki et coll. (1958) ont publié des observations tendant à démontrer que le système L-LCR de la levure serait en réalité composé par une flavoprotéine non héminique et par un cytochrome b_2, dépourvu de flavine, ces deux composantes étant chacune active et pouvant associer leurs activités. Cependant, on admet actuellement que le protohème entre dans la structure de la flavoprotéine elle-même (Appleby et Morton, 1959 ; Singer et coll., 1961) et que les préparations des auteurs japonais correspondaient, en fait, à une forme dénaturée de l'enzyme.

Si le rôle fonctionnel du FMN dans le transport des électrons provenant du L-lactate est bien établi, par contre celui du protohème est encore mal connu (Labeyrie et Slonimski, 1964). D'autre part, le poids moléculaire et la structure de l'enzyme actif sont incertains.

Dans les extraits bruts, la L-LCR est répartie dans le surnageant soluble (70 à 80 %) et dans les particules respiratoires, à partir desquelles on peut, d'ailleurs, la solubiliser par le Tween 80. Les deux formes ont des activités analogues, bien que l'enzyme particulaire réduise moins rapidement le cytochrome c et résiste à l'inactivation par les immunsérums spécifiques (Somlo, 1962).

S. cerevisiae possède, d'autre part, une D-LCR qui a été découverte par Nygaard (1960) dans la levure cultivée en aérobiose, et purifiée par le même auteur (1961 a) et par Gregolin et Singer (1963). Cet enzyme se différencie du précédent, non seulement par sa stéréospécificité à l'égard de l'antipode optique du lactate, mais encore par une série d'autres caractères. Il est entièrement et fortement lié aux particules respiratoires. Son groupement prosthétique est le FAD, et il ne contient pas de groupement héminique, mais son activité est spécifiquement liée à Zn^{++}. L'enzyme purifié contient 3 atomes de Zn par mole de FAD. La D-LCR n'utilise comme accepteurs d'électrons que le cytochrome c et le PMS. Elle est inactive avec le DCIP et le ferricyanure. Sa spécificité de substrat est aussi étroite que celle de la L-LCR, seuls le D-lactate et l'α-hydroxybutyrate étant déshydrogénés. Aucune réversibilité n'a pu être démontrée.

Une particularité intéressante de la D-LCR est son comportement différent à l'égard des deux iso-cytochromes c qui ont récemment été découverts chez S. cerevisiae (Slonimski et coll., 1965). Alors que la L-LCR réduit indifféremment et à la même vitesse les deux espèces moléculaires, la D-LCR est beaucoup plus active avec l'iso-1 qu'avec l'iso-2 cytochrome, bien que tous deux soient d'autre part réoxydés aussi rapidement l'un que l'autre par la cytochrome-oxydase de la levure (Labeyrie et Slonimski, 1964).

Enfin, la levure contient une lactate-déshydrogénase non couplée au cytochrome c et spécifique pour l'isomère D (D-LDH). Cet enzyme a été découvert par Slonimski et Tysarowski (1958) et étudié par Labeyrie et coll (1959). C'est une flavoprotéine soluble qui, en raison de sa grande instabilité, n'a pu être purifiée qu'environ 10 fois. Il a cependant été possible d'identifier ses cofacteurs comme étant le FAD et Zn^{++} (Curdel et coll., 1959 ; Baudras et coll., 1960 ; Iwatsubo et Curdel, 1962). Cette D-LDH a une spécificité de substrat beaucoup moins étroite que les enzymes précédents. Elle oxyde, en plus du D-lactate et du D-α-hydroxybutyrate, toute une série de D-α-hydroxyacides : malate, hydroxy-isobutyrate, hydroxycaproate, hydroxy-isocaproate, hydroxy-isovalérianate et glycérate (Gregolin et coll., 1961). Les accepteurs d'électrons utilisés sont le DCIP, le ferricyanure et le bleu de méthylène, mais pas le PMS. La réversibilité de la réaction catalysée par la D-LDH a pu être démontrée en présence de pyruvate et de $FMNH_2$ (Boeri et coll., 1960).

La possession de ces lactate-déshydrogénases flavoprotéiques assure physiologiquement le développement en aérobiose de S. cerevisiae à partir du lactate. Par contre, on s'explique encore mal la formation de lactate par cet organisme. Il est en effet établi qu'au cours de la fermentation du glucose la levure produit toujours du lactate (Neish et Blackwood, 1951) et que l'isomère formé est le D-lactate (Singer et coll., 1960).

On n'a pas constaté chez la levure de LDH couplée aux pyridine-nucléotides c'est-à-dire d'enzyme ayant fonctionnellement une activité pyruvate-réductase. Certains auteurs (Boeri et coll., 1960) pensent que le D-lactate pourrait

être formé par l'action réversible de la D-LDH qui, comme on le verra plus loin est présente dans les cellules cultivées en anaérobiose. Pour Labeyrie et coll.(1959) le D- lactate pourrait provenir du méthylglyoxal, par l'action de la glyoxalase :

$$CH_3\text{-}CO\text{-}CHO \xrightarrow{+\,H_2O} CH_3\text{-}CHOH\text{-}COOH$$

méthylglyoxal — glyoxalase — D-lactate

3 - REGULATION DES LACTATE-DESHYDROGENASES CHEZ LES MICRO-ORGANISMES

a) Saccharomyces cerevisiae

Les premières données sur la régulation des LDH ont été acquises au cours de la découverte et de l'étude de l' "adaptation respiratoire" chez la levure.

A peu près simultanément, Ephrussi et Slonimski (1950) et Chin (1959) ont établi que les cellules de levure cultivées en anaérobiose sont incapables de respirer en présence de glucose et dépourvues de cytochromes a, b et c Lorsqu'on les place en présence d'oxygène, les suspensions non proliférantes de ces cellules anaérobies reconstituent en quelques heures leur chaîne cytochromique et, parallèlement, retrouvent une activité respiratoire identique à celle des cellules cultivées en aérobiose.

Cette adaptation respiratoire s'accompagne de l'apparition progressive de toute une série d'activités enzymatiques absentes ou très faibles dans les cellules anaérobies (Slonimski, 1956). Les enzymes qui sont ainsi induits par l'oxygène appartiennent au groupe des enzymes d'oxydoréduction participant au catabolisme aérobie (Tableau III) Leur formation s'accompagne d'une baisse de l'activité d'enzymes qui, comme c'est notamment le cas de l'alcool-déshydrogénase, interviennent essentiellement dans la vie fermentative.

Katterman et Slonimski (1960) ont démontré que l'acquisition de ces activités enzymatiques au cours de l'adaptation respiratoire est effectivement liée à la synthèse de novo des enzymes correspondants, comme l'indique le fait que le phénomène est supprimé par les analogues structuraux d'acides aminés.

En ce qui concerne plus particulièrement les LDH, il a d'abord été constaté que l'adaptation respiratoire s'accompagne de la formation de la L-LCR qui, parmi les enzymes de la levure participant au métabolisme du lactate, était à cette époque le seul connu.

La découverte de la D-LDH par Slonimski et Tysarowski en 1958 a conduit à des spéculations qui, par la suite, se sont révélées erronées. En effet, il a été constaté que cette D-LDH, non couplée au cytochrome c, est présente dans les cellules cultivées en anaérobiose. L'enzyme paraissait absent dans les cellules cultivées en aérobiose, qui seules possèdent la L-LCR. De ce fait, il semblait que le passage de l'anaérobiose à l'aérobiose déterminait la conversion, par un mécanisme

TABLEAU III

ENZYMES FORMES AU COURS DE L'ADAPTATION RESPIRATOIRE (1)

ENZYMES	Activité de la levure		Accroissement de l'activité
	non adaptée	adaptée	
Cytochrome c-oxydase (μl O_2/h)	$<$1	180	$>$ 200 x
Cytochrome c-péroxydase	$<$0,03	1,6	$>$ 50 x
Catalase	$<$0,3	10	$>$ 30
Cytochrome c (moles x10^{-10})	env 0,1	1,8	env 20 x
Lactate-cyt. c-réductase (μl H_2/h)	env 0,5	25	env 50 x
α-Glycérophosphate cyt. c-réductase (μl H_2/h)	$<$ 0,2	12	50 x
$NADH_2$-cyt. c-réductase (μl H_2/h)	env 1,6	64	env 40 x
Succinate-cyt. c-réductase (μl H_2/h)	env 0,3	13	env 40 x
Aconitase (μl cis-aconitate/h)	5	96	20 x
Fumarase (μl fumarate/h)	120	800	7 x
Malate-déshydrogénase (NAD) (μl H_2/h)	20	110	6 x
Isocitrate-déshydrogénase (NAD) (μl H_2/h)	7	20	3 x
Alcool-déshydrogénase (NAD) (μl H_2/h)	83	35	0,4 x

(1) Slonimski (1956)

inconnu, de la D-LDH en L-LCR. Cette interprétation paraissait d'autant plus vraisemblable que les analogues structuraux d'acides aminés, s'ils inhibent la formation des autres enzymes induits par l'oxygène au cours de l'adaptation respiratoire, n'empêchent pas l'apparition de l'activité L-LCR (Kattermann et Slonimski 1960).

Cette interprétation a été réfutée par Singer et coll. (1961). Ces auteurs ont démontré que la disparition de l'activité D-LDH, pendant l'adaptation respiratoire est due à une destruction rapide de l'enzyme lorsque les cellules sont placées en suspension non proliférante aussi bien en l'absence qu'en présence d'oxygène. La dégradation de la D-LDH est totalement indépendante de la synthèse de la L-LCR. Ces observations, jointes aux propriétés extrêmement différentes de deux enzymes, montrent bien qu'il s'agit de deux protéines distinctes et dont les biosynthèses sont totalement indépendantes. Très récemment, Somlo [1] a pu établir que la D-LDH est effectivement synthétisée par le levure en aérobiose aussi bien qu'en anaérobiose. Les observations antérieures tendant à suggérer que l'enzyme n'est pas formé en aérobiose étaient, en réalité, dues à deux faits. D'une part, le niveau intracellulaire de la D-LDH dans les cellules cultivées en aérobiose sur glucose dépend à la fois de la concentration initiale du glucose et de la phase de croissance à laquelle les organismes sont récoltés. D'autre part, les techniques usuelles d'extraction inactivent une grande partie de la D-LDH. En opérant en milieu neutre, convenablement tamponné, l'enzyme est préservé et peut être détecté dans toutes les cellules aérobies. Ces faits complètent les observations de Singer et coll. (1961) et confirment l'indépendance complète de la D-LDH et de la L-LCR, et de leurs régulations respectives.

Le comportement à l'égard de l'oxygène de la D-LCR, découverte par Nygaard (1960) est semblable à celui de la L-LCR. Les deux enzymes sont exclusivement formés en aérobiose et leur biosynthèse au cours de l'adaptation respiratoire n'est pas inhibée par les analogues structuraux d'acides aminés (Nygaard, 1961 b).

Somlo (1965) a démontré que les biosynthèse induites de la L-LCR et de la D-LCR exigent non seulement la présence de conditions aérobies, mais encore celle de lactate. En l'absence de ce dernier, les cellules aérobies cultivées sur éthanol possèdent une certaine acrivité de base D- et L-LCR. Mais le lactate, accroît ces niveaux enzymatiques de 5 fois pour la D-LCR et de 6 fois pour la L-LCR. Cette induction par le substrat n'est pas stéréospécifique chacun des énantiomorphes du lactate induisant la biosynthèse des deux enzymes. La D-LDH se distingue des LCR par sa nature "constitutive". Son niveau cellulaire est identique que les organismes soient cultivés en présence ou en l'absence de lactate (Somlo [1]).

Le fait que les activité D-LCR et L-LCR des cellules cultivées sur glucose sont 10 et 100 fois plus faibles que celles des cellules cultivées sur éthanol indique que la biosynthèse de ces deux enzymes est réprimée par le glucose (Somlo, 1965).

(1) Communication personnelle.

D'autres enzymes respiratoires sont également réprimés à des degrés différents. Par contre, le glucose ne semble pas avoir une action directe sur la biosynthèse de la D-LDH bien que le niveau intracellulaire de cet enzyme dans les cellules cultivées en aérobiose dépende de la concentration initiale en glucose (Somlo [1]).

En définitive, les lactate-déshydrogénases sont soumises à trois modes de régulation : (1) induction par l'oxygène, (2) répression par le glucose et (3) induction par le substrat. La D-LDH n'est soumise à aucun de ces mécanismes de régulation, qui s'exercent par contre, de façon plus ou moins marquée sur les deux LCR. Ce schéma général comporte encore des lacunes. En particulier, dans l'état actuel des connaissances, le mécanisme de l'induction par O_2 est encore inconnu

b) Bactéries

Lorsque nous avons entrepris nos recherches sur les LDH des bactéries et leur régulation, plusieurs des notions sur les enzymes de la levure qui viennent d'être brièvement rapportées n'étaient pas encore acquises. C'est ainsi, notamment que l'induction non stéréospécifique de la L-LDH a d'abord été mise en évidence par nous (Pascal et Pichinoty, 1963) chez Aerobacter aerogenes et ultérieurement retrouvée pour les deux LCR de S. cerevisiae (Somlo, 1965). Au moment où nous avons commencé notre travail, le seul mécanisme de régulation qui était alors bien établi chez la levure était l'adaptation respiratoire, c'est-à-dire l'induction par l'oxygène.

La régulation des systèmes respiratoires bactériens a été jusqu'à présent beaucoup moins étudiée que celle des enzymes de la levure. Cependant Englesberg et coll. (1954 a, 1954 b, 1955) ont constaté que l'aérobiose induit, chez Pasteurella pestis, la synthèse d'un cytochrome et de certains enzymes appartenant au cycle tricarboxylique. Il s'agit là d'une adaptation respiratoire moins accusée que chez la levure, mais dont on pouvait se demander si, chez certaines bactéries, elle pouvait inclure la synthèse d'enzyme ayant, comme les lactate-déshydrogénases, une fonction essentiellement oxydative.

Dans notre laboratoire, Pichinoty (1965) a mis en évidence, chez diverses bactéries anaérobies facultatives, un processus de régulation qui est en quelque sorte l'inverse de l'adaptation respiratoire : l'oxygène réprime la biosynthèse des enzymes d'oxydoréduction spécifiques de la vie anaérobie. Cette répression par O_2 s'exerce notamment sur la biosynthèse de l'hydrogénase, de l'hydrogène-lyase et des nitrate, tétrathionate, thiosulfate fumarate et acétoine-réductases. Il était à priori possible qu'une telle répression s'exerce sur les pyruvate-réductases à pyridine-nucléotides, enzymes qui paraissent avoir une fonction purement fermentative. On verra toutefois que cette éventualité n'a pas été constatée chez A. aerogenes.

(1) Communication personnelle.

Les deux mécanismes généraux qui régissent chez les bactéries la biosynthèse des enzymes du catabolisme énergétique sont aujourd'hui bien connus : ce sont l'induction par le substrat et la répression catabolique, ou "effet glucose".

L'induction enzymatique a fait l'objet, au cours des vingt dernières années d'un nombre considérable de travaux qui ont conduit à la théorie de la régulation génétique répressive (Jacob et Monod, 1961). On se bornera ici à rappeler les principales caractéristiques de ce mode de régulation :

(1) - le caractère inductible d'un enzyme est lié à la possession par l'organisme d'un gène régulateur dont le produit (répresseur) inhibe l'expression phénotypique d'un ou de plusieurs gènes de structure constituant, dans ce dernier cas, une unité génétique intégrée (opéron). Certaines mutations portant sur le gène régulateur ou, dans le cas des opérons, sur l'opérateur unique, à partir duquel se déclanche la transcription des gènes de structure, ont pour effet de rendre "constitutif" le ou les enzymes considérés.

(2) - l'inducteur peut être le substrat de l'enzyme inductible, ou certains analogues structuraux non métabolisables. Dans ce dernier cas, il s'agit d'une induction "gratuite"

(3) - en règle générale, la plupart, si ce n'est la totalité, des enzymes cataboliques sont inductibles. Il est possible, en effet, que les enzymes "constitutifs," synthétisés par la cellule quel que soit le milieu, soient en réalité induits par des substances participant nécessairement au métabolisme de l'organisme et, donc, toujours présents

La répression catabolique s'exprime par le phénomène de la diauxie (Monod, 1942). Lorsqu'une bactérie est cultivée dans un milieu contenant à la fois du glucose, et un substrat métabolisé par un enzyme inductible, on constate dans de nombreux cas, que la croissance s'effectue en deux stades successifs. Au cours du premier, qui se prolonge jusqu'à l'épuisement complet du glucose, la croissance s'effectue exclusivement aux dépens du glucose en présence de qui la biosynthèse de l'enzyme inductible, nécessaire à la dégradation du second substrat, est inhibée Cette première phase de croissance est suivie d'une phase stationnaire de latence, pendant laquelle l'enzyme inductible est synthétisé, ce qui permet la reprise de la croissance exponentielle aux dépens du second substrat. Ce comportement a longtemps été décrit sous le nom d' "effet glucose". Cependant, on s'est aperçu par la suite que l'inhibition n'est pas exercée par le glucose lui-même, mais par un produit de son métabolisme intermédiaire (Neidhart et Magasanik, 1956) d'où la nouvelle appellation plus exacte de "répression catabolique" (Magasanik, 1961). Il est maintenant acquis que, dans ce cas, le répresseur est distinct du répresseur " normal" produit par le gène régulateur. En effet, Mandelstam (1962) a obtenu des mutants constitutifs pour un enzyme inductible (β - galactosidase) dont le glucose continue néanmoins à inhiber la biosynthèse.

En ce qui concerne les lactate-déshydrogénases, il n'existait dans la littérature, lorsque nous avons entrepris notre étude, aucune information sur leur inductibilité par le substrat, ni sur l'inhibition de leur biosynthèse par le glucose. Dans une note préliminaire (Pascal et Pichinoty, 1964), nous avons signalé que la L-LDH d' A. aerogenes est réprimée par le glucose. Vers la même époque, Wittenberger et Haaf (1964), ont également constaté l'absence de lactate-déshydrogénase dans les cellules de Butyribacterium rettgeri cultivées en anaérobiose sur glucose, mais n'ont pas précisé la stéréospécificité du ou des enzymes sur lesquels s'exerce cette répression. Très récemment, enfin, Klyne et Mahler (1965) ont constaté que chez E. coli, l'activité D-LDH est "constitutive", tandis que l'activité L-LDH est induite non stéréospécifiquement par le lactate, comme nous l'avions nous-même observé chez A. aerogenes (Pascal et Pichinoty, 1963). Ces auteurs ont, d'autre part, noté des variations dans les propriétés des activités L-LDH suivant la nature du substrat sur lequel la bactérie a été cultivée. Ils ont émis l'hypothèse suivant laquelle la L-LDH induite par le lactate serait une espèce moléculaire différente de la L-LDH synthétisée en l'absence d'inducteur.

•

• •

Au cours du présent exposé, nous adopterons le plan suivant :

1) Mise en évidence et description de la D-LDH et de la L-LDH oxydatives d' A. aerogenes.

2) Etude de la pyruvate-réductase, responsable de la formation de D-lactate par ce même organisme.

3) Régulation de la biosynthèse et de l'activité de ces enzymes. Ce chapitre constituera la partie la plus importante de notre travail.

4) Etude des lactate-déshydrogénases et de la pyruvate-réductase d'autres bactéries.

Chapitre I

MATERIEL ET METHODES

1 - ORGANISMES

La plus grande partie de ce travail a été réalisée avec la souche L III- 1 d'Aerobacter aerogenes, provenant de la collection du Service de Biochimie Cellulaire de l'Institut Pasteur.

On a également utilisé Micrococcus denitrificans, souche n°4 du Laboratoire voor Microbiologie, Technische Hogeschool, Delft (Hollande), et une série d'Entérobactéries, aimablement fournies par M. le Professeur L. Le Minor (Centre des Salmonella et Escherichia, Institut Pasteur) : Aerobacter cloacae 14/63, Klebsiella 9/62, Serratia 57/62, Salmonella typhimurium inter, Hafnia 6/63, Proteus vulgaris 3/62, P. mirabilis 11/62, Citrobacter freundii 3/60 et Escherichia coli ML 30.

Leuconostoc mesentoroides ATCC 12.291 nous a été procurée par le Dr. N.O. Kaplan et la souche 59 RL-5 de Saccharomyces cerevisiae par le Laboratoire de Génétique Physiologique du CNRS (Gif-sur-Yvette).

2 - MILIEUX ET CONDITIONS DE CULTURE

On a employé un milieu synthétique de base, tamponné à pH 7, de composition suivante : $Na_2H\ PO_4.12H_2O$, 3,57 g ; KH_2PO_4, 0,98 g ; $MgSO_4.7H_2O$, 0,03 g ; NH_4Cl, 0,5 g ; $FeSO_4.7H_2O$, 0,005 g ; $CaCl_2.2H_2O$, 0,005 g ; eau, 1000 ml. Pour la culture des espèces auxtrophes, on ajoute 0,1 g par litre d'extrait de levure (Difco).

A ce milieu, les divers substrats carbonés, stérilisés séparément, ont été ajoutés à la concentration de 1 g par litre pour les cultures aérobies et de 2g par litre pour les cultures anaérobies. Dans le cas du lactate de sodium racémique on a mis 2 g par litre, à partir d'une solution commerciale à 60 %.

Les solutions de D- et de L-lactate ont été stérilisées à froids par filtration sur filtre Seitz, afin d'éviter leur isomérisation.

Les cultures aérobies ont été réalisées dans des fioles à toxine de 2 litres contenant 1 litre de milieu, et incubées, sous agitation constante, de façon à assurer une aérobiose totale. Les culture anaérobies ont été effectuées en ballons, sous vide.

Les bactéries ont été récoltées par centrifugation, après 16 heures d'incubation à +32°C, ce qui correspond à la phase stationnaire des cultures dans les milieux employés, où la source de carbone était limitante.

Les grandes quantités de cellules employées pour l'extraction et la purification de la pyruvate-réductase d'A. aerogenes ont été obtenues par cultures massives (100 litres) en aérobiose, sur glucose, dans un fermenteur " Biogen " (American Sterilizer Co.). Les bactéries ainsi cultivées ont été lavées deux fois dans une solution de NaCl à 0,2 %, centrifugées et conservées pendant plusieurs semaines à -25°C, sans perdre leur activité enzymatique.

3 - MESURE DE CROISSANCE

Les densités bactériennes ont été mesurées par opacimétrie avec un spectrophotomètre Jean et Constant, à 450 mμ, et dans des cuves de 1 cm. Elles ont été exprimées en μg de bactéries (poids sec) par ml de culture, en se référant à une courbe étalon.

4 - PREPARATION DES EXTRAITS

Les bactéries, cultivées et récoltées comme il a été précisé, ont été lavées deux fois dans une solution de NaCl à 0,2 % et centrifugées. Dans la plupart des cas, les extraits ont été obtenus par désintégration sonique dans un appareil Raytheon (fréquence, 10 Kc ; temps 4 minutes). Les débris cellulaires ont été éliminés par centrifugation (17 000 x g ; 10 minutes) dont le surnageant, contenant environ 2 mg d'azote protéique par ml, constitue l'extrait brut.

Dans un petit nombre d'expériences préliminaires, les extraits ont été préparés par broyage durant 15 minutes dans un mortier refroidi (-15°C) en présence de poudre d'alumine non calcinée (Prolabo). La préparation, reprise par le même volume de tampon phosphates 0,066 M (pH 7,0), est encore broyé pendant 10 minutes, puis centrifugée comme précédemment. Les activités spécifiques de ces extraits sont comparables à celles des préparations obtenues par désintégration sonique.

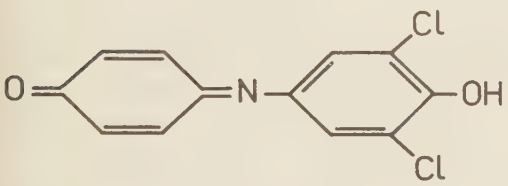
On a enfin préparé quelques extraits par traitement dans une cellule de pression de French, procédé dont les résultats sont pratiquement identiques à ceux des deux autres méthodes.

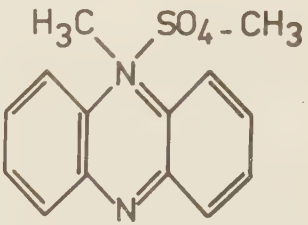
5 - PREPARATION DES SOLUTIONS DE D- ET DE L- LACTATE

Les solutions de D- et de L-lactate utilisées pour les cultures et pour les mesures d'activité ont été préparées de la manière suivante. Les sels de calcium de l'un ou l'autre énantiomorphe (Calbiochem) ont été mis en suspension dans du tampon phosphates 0,33M (pH 7,0) pendant une heure. Le précipité de phosphate de calcium a été éliminé par centrifugation à faible vitesse (1 000 x g; 10 minutes).

6 - MESURE DES ACTIVITES LACTATE-DESHYDROGENASES

Ces activités ont été déterminées avec deux accepteurs artificiels d'électrons, souvent employés pour l'étude des lactate-déshydrogénases : le 2,6-dichlorophénol-indophénol (DCIP) et le phénazine méthosulfate (PMS).





(2,6-dichlorophénol-indophénol)
PM : 268 E'_o = + 0,242 V

(phénazine-méthosulfate)
PM : 306 E'_o = 0,080 V

a) Mesure d'activité en présence de DCIP

Cet accepteur n'étant pas autoxydable, malgré son potentiel standard d'oxydoréduction relativement élevé (E'_o = + 0,242 V), peut être utilisé en présence d'air. La vitesse de sa réduction a été déterminée spectrophotométriquement en suivant, à pH neutre, la décoloration de la forme oxydée bleue, dont le maximum d'absorption est situé à 610 mμ.

Les activités ont été mesurées de façon standard dans des cuves de 1 cm contenant les systèmes suivants : DCIP, 0,18 μmole ; D- ou L-lactate, 40 μmoles, tampon phosphates (pH 7,0), 500 μmoles ; volume total, 4 ml. Au temps zéro, sont ajoutés 0,05 à 0,2 ml d'extrait enzymatique. Les mesures de densité optique sont effectuées à 25° dans un spectrophotomètre Jean et Constant, à 610 mμ, et à intervalles de 30 secondes.

La réaction étant pratiquement du premier ordre, les activités initiales ont été déterminées graphiquement (Fig. 1) en portant, en fonction du temps, le logarithme décimal des variations de la densité optique entre chacune des mesures successives. On voit qu'on obtient ainsi une droite dont l'extrapolation au temps zéro permet d'estimer la vitesse initiale avec une bonne approximation. La réduction d'une mole de DCIP correspondant à la déshydrogénation d'une mole de lactate, les mesures sont exprimées en μmoles de DCIP réduites ou de lactate oxydées par heure et par mg d'azote protéique.

Dans tous les cas, on a déduit des activités mesurées celles d'un système témoin ne contenant pas de lactate.

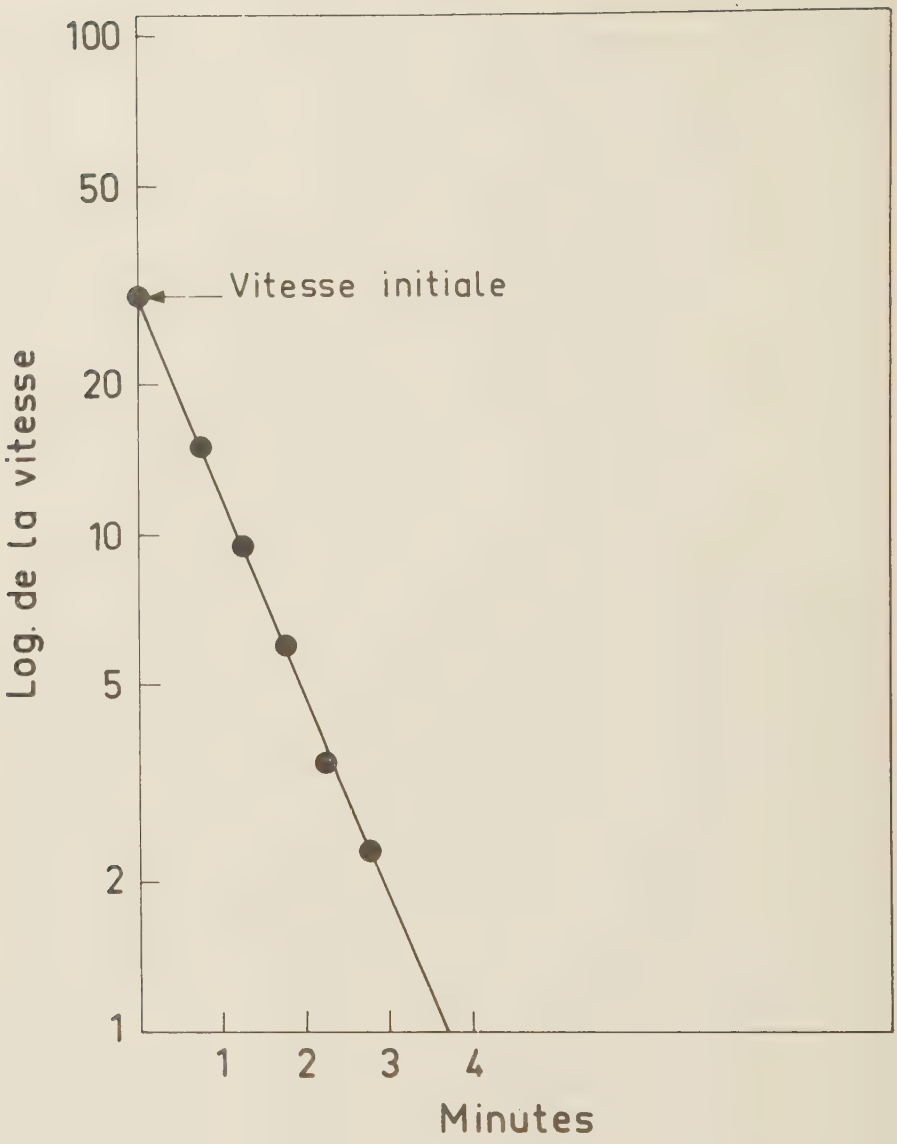


Fig. 1 - Variation du $\log_{10}$ de la vitesse d'oxydation du lactate en fonction du temps. Chaque point représente le $\log_{10}$ de la vitesse moyenne calculée entre deux mesures.

A cause de sa simplicité et de sa rapidité, cette méthode a été systématiquement employée pour la plupart des expériences. Il convient cependant de souligner qu'elle ne permet pas d'opérer en présence de concentrations de DCIP supérieures à $4,5.10^{-5}$ M. De ce fait, il est impossible de se placer dans les conditions où la concentration de l'accepteur serait saturante.

b) Mesure d'activité en présence de PMS

Cet accepteur, dont le potentiel (E'_0 = + 0,080 V) est voisin de celui du bleu de méthylène, est autoxydable et sa réoxydation par l'air conduit à la formation de perhydrol :

$$DH_2 + PMS \xrightarrow{\text{déshydrogénase}} D + PMS.H_2$$

$$PMS.H_2 + O_2 \longrightarrow H_2O_2$$

L'eau oxygénée ainsi produite ayant pour effet d'inhiber la plupart des déshydrogénases en oxydant leurs groupements - SH, il est classique de protéger les enzymes, lorsque leur activité est mesurée en présence de cet accepteur, par l'ion cyanure. On considère habituellement que CN^- exerce un effet protecteur en réduisant les ponts disulfures créés par le perhydrol (Singer et Kearney, 1957).

La forme réduite du PMS étant insoluble, on ne peut mesurer sa vitesse de formation spectrophotométriquement. D'une manière générale, on mesure manométriquement la vitesse de consommation d' O_2 en présence de concentrations en PMS qui inhibent totalement l'activité des catalases qui pourraient être éventuellement présentes dans les préparations enzymatiques essayées (Kearney et Singer, 1956).

La technique employée au cours de ce travail est semblable à celle décrite par Bernath et Singer (1962) pour l'étude de la succinate-déshydrogénase. Les mesures ont été effectuées par la méthode de Warburg dans des systèmes manométriques contenant : PMS, 6,5 µmoles ; KCN, 3 µmoles ; D- ou L- lactate, 12 µmoles ; tampon phosphates (pH 7,0), 160 µmoles ; volume total, 3 ml ; température, 37° ; phase gazeuse, air. Le substrat est placé dans le diverticule. Les mesures sont effectuées à intervalles de 5 minutes.

La vitesse de la réaction n'est linéaire que pendant environ 10 minutes et tend ensuite à décroître, par suite de la décomposition du PMS sous l'influence de la lumière (Singer et Kearney, 1957). Une mole d' O_2 étant consommée par mole de lactate déshydrogénée, les activités initiales ont été exprimées, à partir des vitesses de consommation de l'oxygène, en µmoles de lactate oxydées par heure et par mg d'azote protéique.

7 - MESURE DES ACTIVITES LACTATE-CYTOCHROME C-REDUCTASES

Les mesures ont été effectuées à 550 mμ (spectrophotomètre Jean et Constant), dans des cuves de 1 cm contenant : D- ou L-lactate, 40 μmoles ; cytochrome c de coeur de boeuf (Sigma), 0,15 μmole ; KCN, 4 μmoles ; tampon phosphates (pH7,0), 600 μmoles ; volume total, 4 ml ; température, 25°. L'extrait enzymatique (0,2 ml) est ajouté au temps zéro.

L'addition de cyanure dans ces systèmes est destinée à inhiber le système cytochrome-oxydase qui est présent dans les extraits de Micrococcus denitrificans (Vernon et White, 1957) et à empêcher ainsi la réoxydation du ferrocytochrome c.

A partir des mesures spectrophotométriques, la vitesse initiale de la réduction du cytochrome c et, corrélativement, celle de l'oxydation du lactate, sont déterminées graphiquement par extrapolation, suivant la méthode déjà décrite le DCIP.

8 - MESURE DE L'ACTIVITE PYRUVATE-REDUCTASE

Les vitesses de réduction du pyruvate à partir du $NADH_2$ ont été déterminées à 25°C, en mesurant la diminution de la densité optique à 340 mμ (Spectrophotomètre Zeiss PMQ II). Les systèmes placés dans des cuves de 1 cm, avaient la constitution suivante : $NADH_2$ (Sigma), 0,35 μmole ; pyruvate de Na, 20 μmoles ; tampon phosphates (pH 7,0), 330 μmoles ou tampon Tris-HCl (pH 7,1), 100 μmoles ; volume total, 3 ml. L'extrait (0,025 à 0,1 ml) était ajouté au temps zéro et les mesures de densité optique effectuées à intervalles de 15 secondes. On s'est assuré de ce que la réoxydation du $NADH_2$ dans les systèmes témoins ne contenant pas de pyruvate est négligeable dans les conditions de ces mesures.

Les vitesses initiales de l'oxydation du $NADH_2$ et, corrélativement, de la réduction du pyruvate ont été déterminées graphiquement d'après la tangente à l'origine des courbes spectrophotométriques.

Les méthodes employées en vue de mettre en évidence la réversibilité de la réaction, c'est-à-dire la réduction du NAD par les extraits en présence de lactate, sont décrites dans le Chapitre III.

9 - METHODES ANALYTIQUES

a) Identification des antipodes optiques du lactate

Le D- et le L-lactate produits par les cultures et par les extraits ont été identifiés par des méthodes enzymatiques.

En ce qui concerne le D-lactate, on a employé une préparation de D-lactate-déshydrogénase obtenue à partir d'une culture en anaérobiose, sur glucose,

de la souche 59 RL-5 de Saccharomyces cerevisiae, et purifiée suivant la technique de Slonimski et Tysarowski (1958). Cette préparation oxyde spécifiquement le D-lactate en présence de ferricyanure comme accepteur final et est totalement inactive à l'égard du L-lactate.

L'essai est effectué de la manière suivante. Dans une cuve spectrophotométrique de 1 cm, on dispose 0,1 à 0,2 ml d'échantillon de lactate, 2,1 µmoles de $K_3Fe(CN)_6$, 200 µmoles de tampon phosphates (pH 7,3) le volume total étant de 3 ml. L'extrait enzymatique (0,025 à 0,25 ml) est introduit au temps zéro. La présence de D-lactate s'exprime par une diminution progressive et linéaire de la densité optique à 420 mµ.

Le L-lactate a été caractérisé à l'aide de la L-lactate déshydrogénase cristallisée de muscle cardiaque (Sigma). Les systèmes contenaient 0,05 à 0,1 ml d'échantillon de lactate, 2 µmoles de NAD, 170 µmoles de tampon glycine-NaOH (pH 10,0) le volume total étant porté à 3 ml. Les mesures sont effectuées spectrophotométriquement à 340 mµ à intervalles de 30 secondes après l'introduction de l'enzyme (0,025 ml de la solution commerciale diluée 100 fois). La présence de L-lactate se traduit par un accroissement de la densité optique, tendant asymptotiquement vers un équilibre.

b) Dosages

Le lactate a été dosé colorimétriquement par la méthode de Barker et Summerson (1941). Le pyruvate a été estimé colorimétriquement sous forme de 2,4-dinitrophénylhydrazone (Umbreit et coll., 1957) et le fumarate par mesure de la densité optique à 220 mµ, longueur d'onde située dans la zone d'absorption de la double liaison.

Le glucose a été dosé par la méthode au ferricyanure de Park et Johnson (1949).

La teneur en azote des extraits bruts a été déterminée par la méthode de Kjeldahl. Les protéines ont été dosées par la méthode colorimétrique de Folin modifiée par Lowry et coll. (1951).

Chapitre II

MISE EN EVIDENCE ET PROPRIETES DE LA D- ET DE LA L-LACTATE-DESHYDROGENASE D' AEROBACTER AEROGENES

1- CROISSANCE SUR LACTATE ET ACTIVITE DES CELLULES ENTIERES

Aerobacter aerogenes L III-1, se développe en aérobiose dans des milieux synthétiques contenant comme seule source de carbone et d'énergie, soit de l'acide DL-lactique, soit un seul de ses isomères (Fig. 2). Le temps moyen de division cellulaire est sensiblement plus court sur L-lactate (θ =1heure, 30 minutes) que sur D-lactate (θ = 2 heures, 30 minutes), bien que les rendements moléculaires de la croissance à partir de ces deux substrats soient presque identiques et, respectivement, de 14,4 et 16,2 g de cellules produites par mole de substrat métabolisée En anaérobiose, aucune croissance de l'organisme étudié ne s'observe sur lactate.

Le Tableau IV montre que les suspensions non proliférantes des cellules aérobies cultivées sur lactate métabolisent les deux formes isoméniques de l'acide lactique quelle que soit celle à partir de laquelle les organismes se sont développés. Les $^{Q}O_2$, mesurés par la méthode de Warburg à 37° et pH 7,0 (tampon phosphates), varient sensiblement d'une expérience à l'autre et sont compris entre 35 et 75 μl de gaz consommés par heure et par mg de cellules (poids sec) Dans le but d'éliminer toute possibilité d'adaptation secondaire au cours des essais, ceux-ci ont été systématiquement réalisés en présence d'une concentration de chloramphénicol (5 μg/ml) suffisante pour inhiber complètement les synthèses protéiques.

2- ACTIVITE RESPIRATOIRE DES EXTRAITS BRUTS

Les extraits obtenus à partir des bactéries cultivées en aérobiose sur DL-lactate oxydent le D- et le L-lactate, mais sont totalement inactifs à l'égard du pyruvate (Fig. 3 et Tableau V). Les bilans métaboliques correspondent à la conversion stoechiométrique du lactate en pyruvate :

$$CH_3\text{-}CHOH\text{-}COOH + 1/2\ O_2 = CH_3\text{-}CO\text{-}COOH + H_2O$$

Il n'existe donc pas chez A aerogenes de système similaire à celui de Mycobacterium phlei (Sutton, 1957), qui oxyde directement le L-lactate en

TABLEAU IV

ACTIVITES RESPIRATOIRES DES CELLULES A L'EGARD DU D- ET DU L-LACTATE

Conditions de culture	Activités ($^{Q}O_2$)	
	D-lactate	L-lactate
DL-lactate + O_2	43	35
	69	65
D-lactate + O_2	62	72
L-lactate + O_2	72	52

Conditions expérimentales : tampon phosphates (pH 7,0), 160 µmoles; D- ou L-lactate, 32 µmoles ; chloramphénicol, 15 µg ; bactéries, 5 mg (poids sec) environ ; KOH, 0,1 ml (puits central) ; volume total, 3 ml ; température, 37°. Les $^{Q}O_2$ sont exprimés en µl d'O_2 consommés par heure et par mg de bactéries (poids sec), respiration endogène déduite.

en acétate et CO_2, sans passer par le pyruvate libre,

Le D-lactate est oxydé par les extraits bruts environ deux fois plus rapidement que le L-lactate.

3 - RECHERCHE D'UNE RACEMISATION DE L'ACIDE LACTIQUE

Les observations précédentes montrent que A. aerogenes, cultivé en aérobiose sur DL-lactate, possède un équipement enzymatique qui lui permet d'oxyder en pyruvate les deux stéréoisomères de l'acide lactique. Cette activité peut être assurée a priori, soit par l'existence de deux lactate-déshydrogénases stéréospécifiques, soit par l'association fonctionnelle d'une déshydrogénase et d'une racémase.

On a cherché à mettre en évidence une racémisation éventuelle de l'acide lactique par les extraits ou par les cellules d'A. aerogenes. Les essais ont été effectués en anaérobiose, sous azote, dans des tubes de Thunberg, de façon à éviter l'oxydation du substrat. Les systèmes, d'un volume total de 3 ml, contenaient 0,5 ml d'une suspension de bactéries (7,9 mg, poids sec) cultivées sur DL-lactate, ou d'extrait acellulaire (0,9 mg d'azote protéique), 120 µmoles de D- ou de L-lactate et 66 µmoles de tampon phosphates (pH 7,0). Dans les cas des extraits, on a ajouté à certains systèmes 0,3 µmole de NAD ce cofacteur pouvant éven-

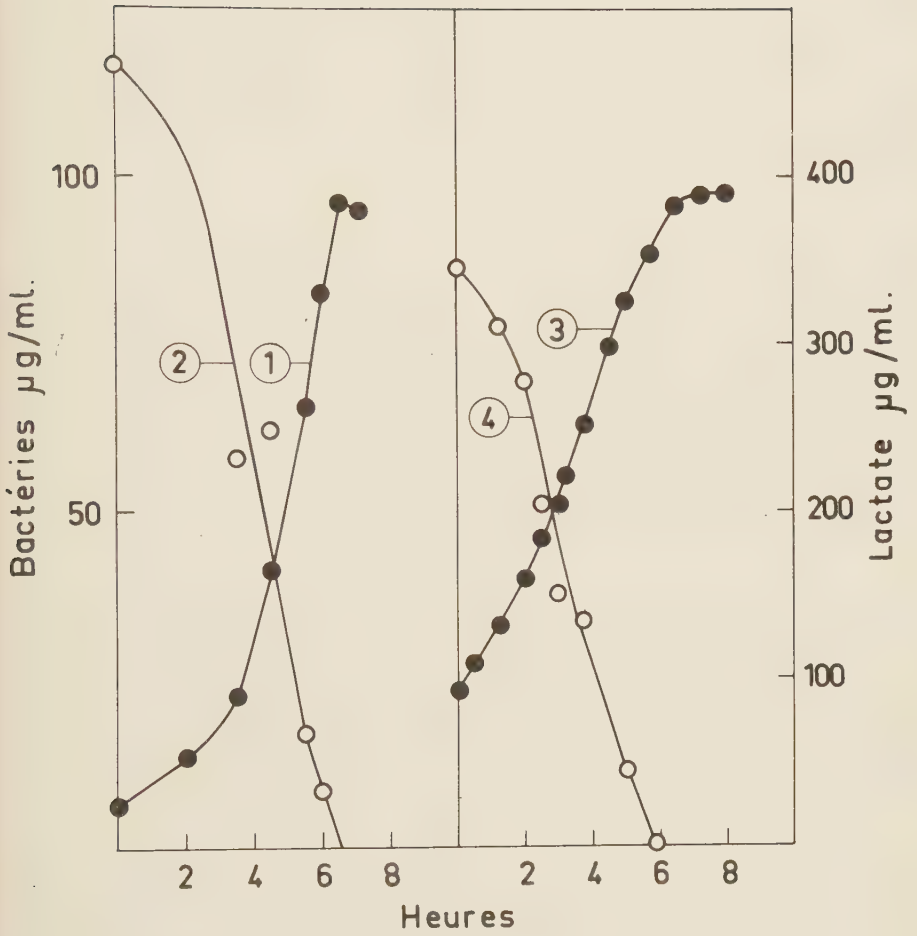


Fig. 2 - Croissance aérobie à 37° sur L-lactate (partie gauche) et D- lactate (partie droite). Les concentrations en lactate sont exprimées en µg d'acide par ml. Courbes (1) et (3) : bactéries. Courbe (2) : L-lactate. Courbe (4) : D-lactate.

TABLEAU V

ACTIVITE RESPIRATOIRE D'UN EXTRAIT PROVENANT D'UNE CULTURE AEROBIE SUR DL-LACTATE

Substrat initial	$^{Q}O_2$	O_2 consommé (µmoles)	Pyruvate formé (µmoles)
D-lactate (12 µmoles)	305	5,6	11,7
L-lactate (12 µmoles)	129	5,3	11

Conditions expériementales identiques à celles de la Fig 3. Les $^{Q}O_2$ sont mesurés d'après les 20 premières minutes et exprimés en µl d'O_2 consommés par heure et par mg d'azote protéique total.

tuellement être requis pour un processus de racémisation indirecte par action conjuguée de deux LDH à pyridine-nucléotides.

Après 3 heures d incubation à 37°, les systèmes ont été chauffés à 100° pendant 3 minutes, puis centrifugés. L'analyse des surnageants par les techniques enzymatiques décrites dans le Chapitre des Méthodes n'a montré aucune interconversion des deux formes de l'acide lactique.

Les résultats négatifs de ces essais éliminent l'hypothèse d'une racémisation directe ou indirecte de l'acide lactique Corrélativement, ils suggèrent l'existence de deux lactate-déshydrogénases stéréospécifiques agissant, l'une sur la forme D (D-LDH) et l'autre sur la forme L (L-LDH). On verra par la suite que cette interprétation s'est trouvée vérifiée par le fait que les deux enzymes se distinguent par un certain nombre de propriétés et par la régulation différente de leur biosynthèse

4 - ACCEPTEURS D ELECTRONS

En présence de D- ou de L-lactate, les extraits réduisent le 2,6-dichlorophénol-indophénol (DCIP) et le phénazine-méthosulfate (PMS). Dans les conditions de nos expériences, le rapport des activités à l'égard de ces deux accepteurs artificiels (DCIP/PMS) est de 3 pour la D-LDH et de 1,4 pour la L-LDH.

Il convient de souligner, cependant, que les mesures étant faites dans des conditions différentes, ces valeurs n'ont qu'un intérêt relatif.

En ce qui concerne le DCIP, on a vérifié analytiquement que la réduction d'une mole de cet accepteur correspond à la formation d'une mole de pyruvate à partir de D- ou de L-lactate. D'autre part, la vitesse de réduction de l'accepteur est directement proportionnelle à la quantité d'extrait (Fig 4)

Les extraits ne réduisent ni le ferricyanure, ni le cytochrome c de cœur de bœuf. Ils sont, de même, sans action sur le NAD et sur le NADP, dans l'intervalle de pH compris entre 7 et 10.

5 - SPECIFICITE DE SUBSTRATS

Les deux LDH d' A. aerogenes présentent une spécificité de substrat assez étroite. Les extraits de bactéries cultivées sur glucose qui ne contiennent, comme il sera précisé ultérieurement que la D-LDH, oxydent le DL- α-hydroxy butyrate 10 fois plus lentement que le D-lactate, et sont totalement inactifs à l égard du D-malate.

D'autre part, les extraits contenant les deux enzymes sont sans action sur le glycolate et sur les dérivés DL- α-hydroxylés des acides isobutyrique, valérianique, caproïque et isocaproïque.

6 - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRATS SUR LES ACTIVITES LACTATE-DESHYDROGENASES

Les constantes de Michaëlis ont été déterminées expérimentalement (Fig 5) par la méthode graphique de Linnewaever et Burk, en présence d'une concentration fixe et limitante ($4,5.10^{-5}$ M) de DCIP et de concentration croissantes de D- et de L-lactate.

Dans ces conditions, Km = $4,2.10^{-4}$ M pour la D-LDH et $4,7.10^{-5}$ M pour la L-LDH.

7 - INHIBITEURS

Le glyoxylate 10^{-3} M inhibe de façon semblable la D-LDH (60 %) la L-LDH (70 %) L'oxylate, à la même concentration, présente la propriété intéressante d'inhiber de 70 % l'activité D-LDH, et de n'avoir aucun effet inhibiteur sur l'activité L-LDH. Aucune des deux activités n'est inhibée par le glycolate 10^{-3} M. D'autre part, on n'a constaté d'inhibition ni par les agents complexants (EDTA, o phénantroline et $\alpha\,\alpha$ -dipyridyle) à la concentration $5\ 10^{-3}$ M, ni par le monoiodoacétate 10^{-3} M.

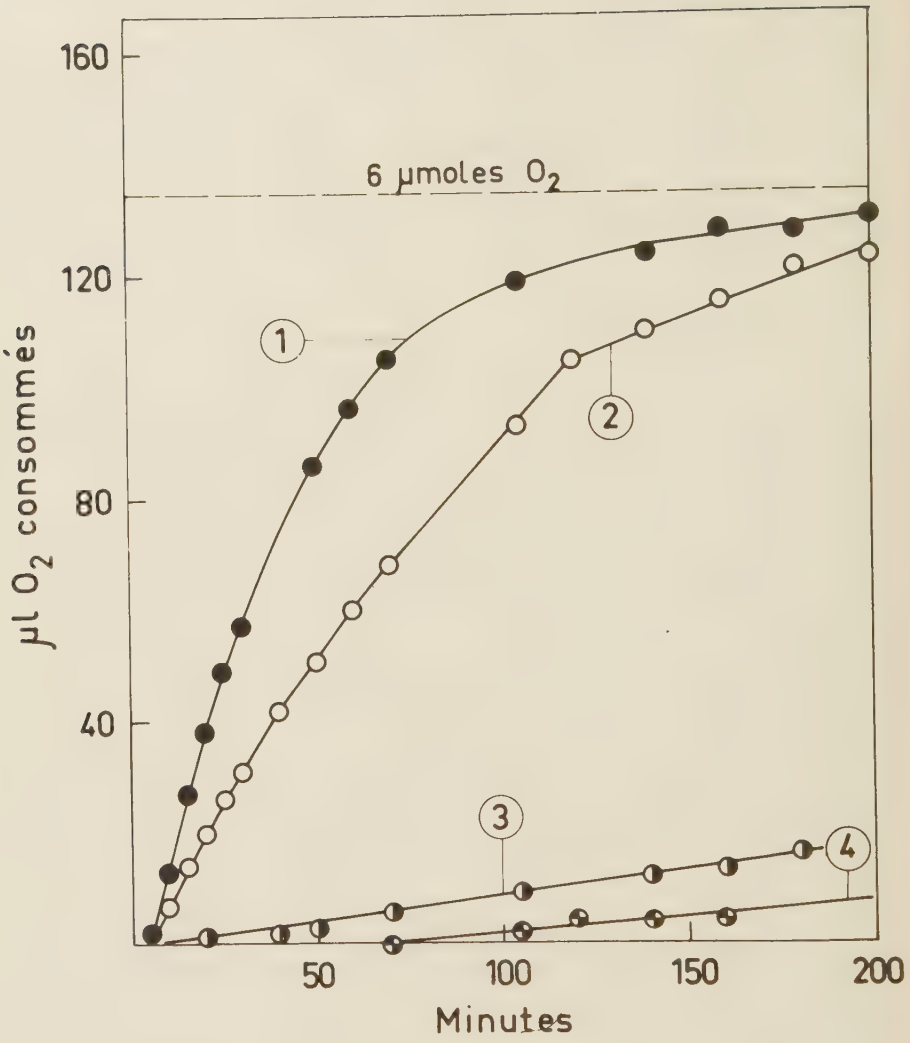


Fig. 3 - Oxydation des D- et L-lactates et du pyruvate par un extrait provenant d'une culture aérobie sur DL-lactate. Conditions expérimentales : tampon phosphates (pH 7), 150 µ moles ; D- ou L-lactate, 12 µ moles, ou pyruvate 10 µ moles ; extrait, 0,5 mg d'azote protéique ; KOH, 0,1 ml (puits central) ; volume total, 3 ml ; température, 37°. Courbe (1) : D-lactate. Courbe (2) : L-lactate. Courbe (3) : pyruvate. Courbe (4) : témoin sans substrat.

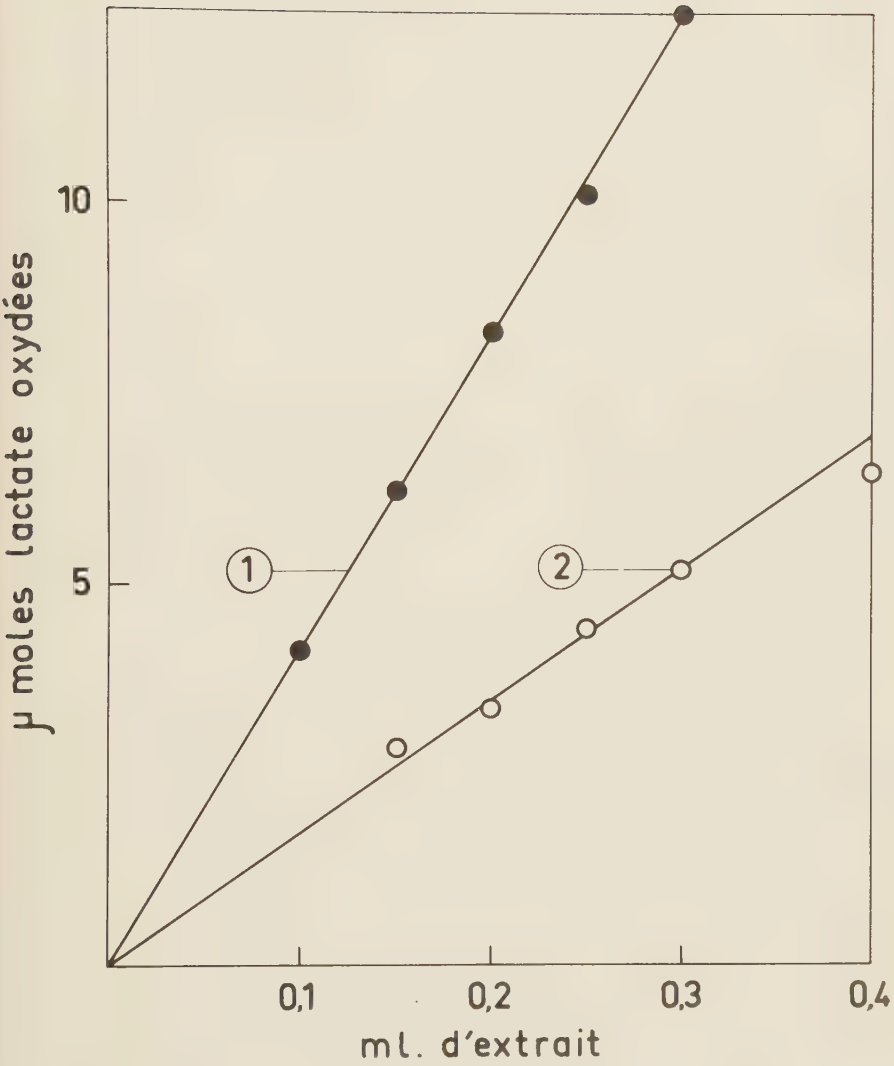


Fig. 4 - Vitesse d'oxydation des D- et L-lactates en fonction du volume d'extrait. Les vitesses sont exprimées en μ moles de lactate oxydées par heure. L'extrait provient d'une culture aérobie sur lactate et contient 1,4 mg d'azote par ml. Courbe (1) : D-lactate. Courbe (2) : L-lactate.

TABLEAU VI

REPARTITION DES ACTIVITES LDH DANS LES FRACTIONS SUBCELLULAIRES

	Activités totales		Activités spécifiques	
	D-LDH	L-LDH	D-LDH	L-LDH
Extrait initial	1520	811	28,7	15,3
Particules	625	439	55,8	39,2
Surnageant	393	188	9,6	4,6
$\frac{\text{Particules + surnageant}}{\text{extrait initial}}$	67 %	76 %		
$\frac{\text{Particules}}{\text{Particules + surnageant}}$	61 %	70 %		

L'extrait (52,9 mg d'azote protéique) est centrifugé à 140 000 x g pendant 2 heures. Le sédiment est lavé à l'eau distillée et centrifugé à nouveau dans les mêmes conditons. Les activités totales sont exprimées en µmoles de lactate oxydées en une heure.

8 - CENTRIFUGATION FRACTIONNEE DES EXTRAITS

On a déjà indiqué, à propos des méthodes, que les activités D-LDH et L-LDH se trouvent dans le surnageant des extraits bruts centrifugés à 17 000 x g pendant 10 minutes. Une grande partie de ces activités est cependant associée à de petites particules qui sédimentent par centrifugation à 140 000 x g pendant 2 heures. Les résultats rapportés sur le Tableau VI montrent que la centrifugation des extraits inactive partiellement les deux LDH et que des proportions comparables de la D-LDH (61 %) et de la L-LDH (70 %) se trouvent dans la fraction particulaire.

9 - IDENTIFICATION DU GROUPEMENT POSTHETIQUE DE LA L-LDH

Dans le but de dissocier et d'identifier le cofacteur des deux LDH, les extraits ont été soumis à un traitement semblable à celui qui a été utilisé par Warburg et Christian (1938) pour la résolution des flavoprotéines.

Les opérations ont été conduite à -10° et en moins de 10 minutes. L'extrait (20 ml) a été additionné de sulfate d'ammonium, jusqu'à 35 % de saturation puis acidifié à pH 2,0 par HCl 2N et la concentration en $(NH_4)_2SO_4$ portée à 70% de saturation. Le précipité est recueilli par centrifugation à 20 000 x g et remis en suspension dans 12 ml de tampon phosphates 0,1 M (pH 7,0), contenant de l'EDTA à la concentration 10^{-4} M Le pH est porté à 7,0 avec de l'ammoniaque.

TABLEAU VII

DISSOCIATION DE LA FLAVINE DE LA L-LDH PAR TRAITEMENT ACIDE ET RESTAURATION PARTIELLE DE L'ACTIVITE

	Activité	% d'activité
Extrait initial	21,6	
Extrait traité	2,85	13
Extrait traité + FAD 2.10^{-5} M	2,85	13
Extrait traité + FMN 2.10^{-5} M	7,6	35

Les extraits ainsi traités ont totalement et irréversiblement perdu leur activité D-LDH L'activité L-LDH ne représente plus que 13 % de l activité initiale. Cette activité résiduelle n'est pas accrue par l'addition de FAD $2\ 10^{-5}$ M ; elle est, par contre, restaurée jusqu'à 35 % de sa valeur initiale par la même concentration de FMN (Tableau VII) qui de ce fait, semble devoir être considéré comme étant le coenzyme de la L-LDH.

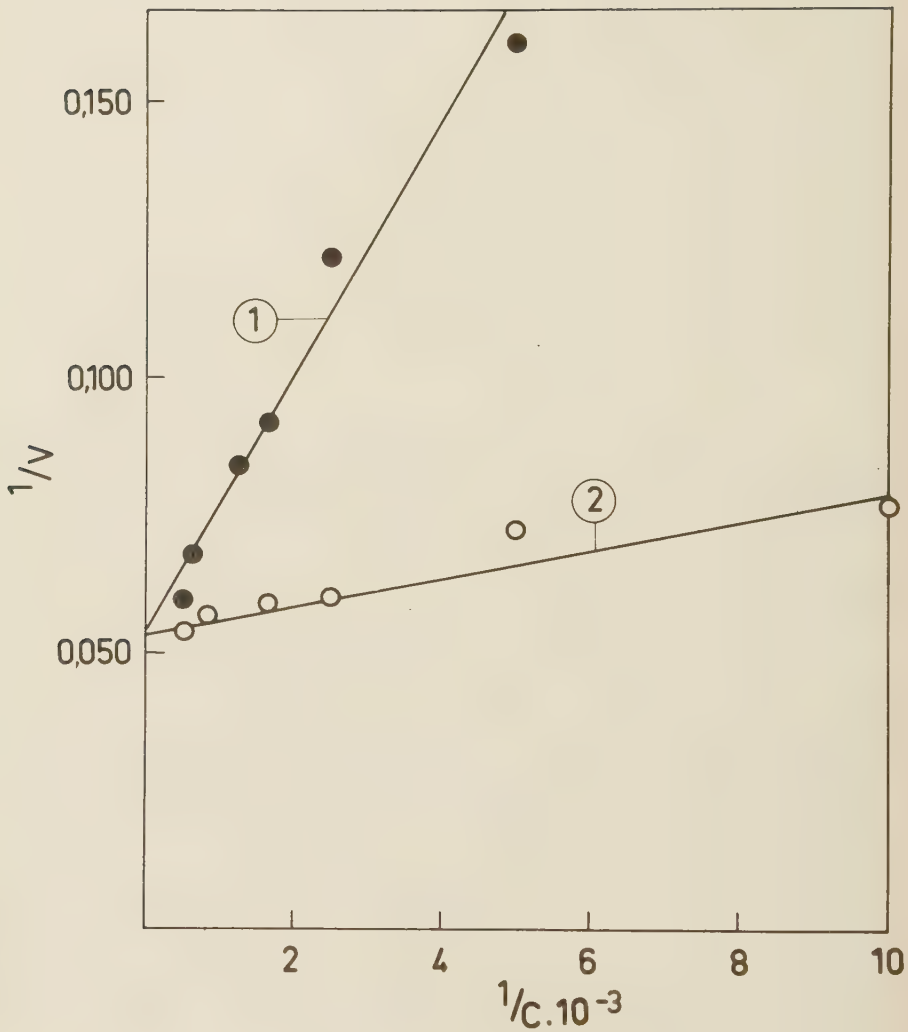
10 - IRREVERSIBILITE DES DEUX LACTATE-DESHYDROGENASES

On pouvait se demander si les LDH d'A aerogenes fonctionnent comme pyruvate-réductases en présence de donateurs d'électrons ayant un potentiel d'oxydo réduction inférieur à celui du couple lactate-pyruvate (E'_o = -0,180 Volt) Nous avons choisi dans ce but le FMN (E'_o = -0,220 Volt) et le benzyl viologène (E'_o = - 0,359 Volt).

Dans le cas du FMN, les essais ont été effectués spectrophotométriquement dans des cuves de 4 ml, contenant 0,26 µmole de FMN, 50 µmoles de pyruvate, 0,3 ml d extrait enzymatique et 330 µ moles de tampon phosphates (pH 7,0). Au temps zéro, le FMN est réduit chimiquement par l'addition de 4 µmoles d'hydrosulfite, et sa réoxydation est suivie par la variation de densité optique à 449 mµ.

Dans le cas du benzyl-viologène, on a employé la méthode manométrique décrite par Pichinoty (1963). Les systèmes contenaient 10 µmoles de pyruvate. 100 µg de chlorhydrate de benzyl-viologène 0,2 ml de préparation standard d'hydrogénase obtenue à partir de Desulfovibrio desulfuricans des quantités croissantes de D-LDH et L-LDH et 330 µmoles de tampon phosphates (pH 7 0) sous atmosphère d'hydrogène

Les résultats de ces essais ont été constamment négatifs et n'ont jamais



Fg. 5 - Détermination graphique des constantes de Michaelis. L'extrait provient d'une culture aérobie sur lactate. Afin d'éliminer les substrats endogènes, il est dialysé pendant 2 heures contre du tampon Tris-HCl 0,01 M (pH 7,2) renouvelé toutes les 15 minutes. Courbe (1) : D-lactate. Courbe (2) : L-lactate. Concentrations en substrat variant de $0,2.10^{-3}$ à 2.10^{-3} M pour le D-lactate et de $0,1.10^{-3}$ à 2.10^{-3} M pour le L-lactate.

montré de réduction du pyruvate par les préparations possédant les activités D- et L-LDH.

II- DISCUSSION

Ces faits démontrent l'existence, chez A. aerogenes cultivé en aérobiose sur DL-lactate, de deux enzymes stéréospécifiques distincts, catalysant respectivement la déshydrogénation en pyruvate du D-lactate (D-LDH) et du L-lactate (L-LDH). Les deux enzymes sont particulaires. Ils ne fonctionnent pas comme pyruvate-réductaseset paraissent donc avoir essentiellement une fonction oxydative. Ni l'un ni l'autre n'est couplé aux pyridine-nucléotides (NAD et NADP).

L'absence d'inhibition par les agents complexants du fer et des autres métaux lourds, suggère que l'activité des deux enzymes n'est pas liée à la possession d'un métal labile.

Aucun des deux enzymes ne réduit le cytochrome c des mammifères. A ce sujet, il convient de souligner qu'A. aerogenes est dépourvu de cytochrome de type c, mais possède, par contre, des cytochromes a_1, a_2, b_1 et o (Smith, 1954). Nos expériences ne permettent pas de préciser si les déshydrogénases étudiées sont ou non capables de céder à cette chaîne cytochromique, les électrons provenant du lactate.

Les deux LDH se distinguent entre elles par un certain nombre de propriétés. Tout d'abord, la constante de Michaëlis de la D-LDH ($Km = 4,2.10^{-4}M$) est 10 fois plus élevée que celle de la L-LDH ($Km = 4,7.10^{-5}$ M). D'autre part, la D-LDH est inhibée à 70 % par l'oxalate à une concentration qui n'a aucun effet sur l'activité L-LDH. Enfin, dans le cas de la L-LDH, les expériences de dissociation de l'enzyme par le sulfate d'ammonium, ont permis d'identifier le FMN comme étant le cofacteur. La nature de celui-ci n'a pu être déterminée dans le cas de la D-LDH.

Ces LDH oxydatives diffèrent profondément par leurs propriétés et par leur fonction des déshydrogénases bactériennes à NAD et en particulier des D-LDH et L-LDH de Lactobacillus plantarum (Dennis et Kaplan, 1960) et de la L - LDH récemment mise en évidence chez Bacillus subtilis par Yoshida (1965).

Les principales caractéristiques des LDH non couplées au NAD, qui ont été mises en évidence chez d'autres bactéries et chez Saccharomyces cerevisiae, sont rassemblées sur le Tableau VIII. On voit qu'il existe entre ces enzymes et ceux d'A. aerogenes des similitudes et des différences qui ne peuvent être systématisées.

Parmi ces déshydrogénases, les deux seules qui soient actives avec le cytochrome c de mammifère sont les D-etL lactate-cytochrome c-réductase de la levure (Nygaard, 1961 a ; Appleby et Morton, 1954). La D-LDH "anaérobie" de S. cerevisiae (Slonimski et Tysarowski, 1958) présente une certaine similitude

TABLEAU VIII

COMPARAISON DE DIVERSES LACTATE-DESHYDROGENASES MICROBIENNES A COENZYMES NON PYRIDINIQUES

		groupement prosthétique	effet des chélateurs et métal réactivant	Accepteurs				inhibition par oxalate	spécificité de substrat	Réf.
				cyt. c	Ferricyanure	DCIP	PMS			
A. aerogenes	D-LDH	?	0	0	0	+	+	+	étroite	
	L-LDH	FMN	0	0	0	+	+	0	étroite	
Levure	D-LDH	FAD	Zn^{++}	0	+	+	0	+	large	(1)
	D-LCR	FAD	Zn^{++}	+	0	0	+	+	étroite	
	L-LCR	prototème et FMN	0	+	+	+	+	0	étroite	
Propionibacterium pentosacenm	D-LDH	?	0	0	?	+	+	+	étroite	(2)
Lactobacillus arabinosus	D-LDH	?	?	0	0	+	?	+	étroite	(3)
	L-LDH	FMN	0	0	0	+	?	+	étroite	
Leuconostoc mesenteroides	D-LDH	?	0	0	0	+	?	+	étroite	(4)

Références : (1) : Gregolin et coll (1961) ; (2) : Molinari et Lara (1960) ;
(3) : Snoswell (1963) ; (4) : Kaufmann et Dikstein (1961).

avec la D-LDH d'A. aerogenes. Elle en diffère cependant par le fait qu'elle réduit le ferricyanure, qu'elle est inactive avec le PMS, et qu'elle oxyde, en dehors du D-lactate et du D-α -hydroxybutyrate, une grande variété d'autres α -hydroxyacides, dont le D-malate (Gregolin et coll. 1961).

En ce qui concerne les L-LDH bactériennes, notons que, lorsque le coenzyme a pu être identifié, celui-ci s'est révélé être le FMN. La L-LDH d'A. aerogenes se rapproche ainsi de celle de Lactobacillus arabinosus. Elle s'en distingue cependant par son insensibilité à l'égard de l'oxalate.

Certaines LDH bactériennes ont été mises en évidence, sans que leurs activités et leurs stéréospécificités aient été étudiées de façon suffisamment approfondie pour permettre de les inclure sur le Tableau VIII. C'est ainsi que la possession de deux déshydrogénases spécifiques (D-LDH et L-LDH) par Pseudomonas natriegens (Walker et Eagon, 1964) ne peut être affirmée en l'absence de données éliminant expérimentalement l'existence, chez cet organisme, d'une racémase. Les activités LDH de P. natriegens ressemblent toutefois à celles d'A. aerogenes par le fait qu'elles sont couplées au DCIP et au PMS et ne fonctionnent pas avec le ferricyanure. La D-LDH et la L-LDH d' Escherichia coli, au contraire, utilisent ce dernier accepteur (Klyne et Mahler, 1965).

Les activités D- et L-lactate-oxydases qui ont été mises en évidence chez Acetobacter peroxydans (De Ley et Schel, 1959) n'ont pas été suffisamment étudiées pour qu'on puisse tirer des conclusions quant à la nature des enzymes en cause.

La nature particulaire de ces LDH rend leur purification et leur séparation difficiles. A l'heure actuelle, les seules lactate-déshydrogénases qui aient pu être purifiées et séparées sont les LDH solubles de L. arabinosus (Snoswell, 1963) et les deux lactate-cytochrome c-réductases de la levure (Appleby et Morton, 1954 ; Nyggard, 1961 a).

Chapitre III

LA PYRUVATE-REDUCTASE A PYRIDINE-NUCLEOTIDE D'AEROBACTER AEROGENES

1- ACCUMULATION DE D-LACTATE DANS LES CULTURES

On sait depuis longtemps que l'acide lactique figure parmi les principaux produits métaboliques de la fermentation acide mixte d'A. aerogenes et de la dégradation aérobie des sucres par cet organisme. Altermatt et coll. (1955) ont montré qu'en aérobiose comme en anaérobiose A. aerogenes produit à partir du D-glucose et du D-allose 0,06 à 0,18 mole de lactate par mole de sucre métabolisé, mais n'ont cependant pas précisé la forme stéréoisomérique de l'acide lactique formé.

L'origine de ce lactate pose un problème du fait que, comme on l'a établi dans le chapitre précédent, la D-LDH et la L-LDH flavoprotéiques d'A. aerogenes sont des enzymes à fonction exclusivement oxydative et ne peuvent, par conséquent, expliquer la production d'acide lactique. Ceci suggère la possession par l'organisme considéré d'un système enzymatique distinct, responsable de la formation de lactate.

Dans une série d'expériences préliminaires, on a systématiquement recherché et caractérisé le lactate dans des cultures anaérobies d'A. aerogenes en milieu glucosé synthétique. Après 24 à 48 heures d'incubation sous vide à + 32°, les cultures ont été centrifugées et le surnageant, acidifié par quelques gouttes de H_2SO_4 concentré, a été soumis à une extraction continue par l'éther sulfurique dans un appareil de Kutscher-Steudel, pendant 48 heures. Après évaporation du solvant, le résidu a été repris par quelques ml d'eau distillée, puis desséché sous vide en présence de KOH et de P_2O_5, ce qui élimine les acides volatils, acétique et formique. Les acides D- et L-lactiques ont été recherchés par les méthodes enzymatiques sur le résidu final, repris avec 2 ml d'eau distillée et ramené à pH 7,0.

Ces essais, répétés à diverses reprises, ont toujours montré la formation de D-lactate. Celui-ci a été caractérisé par la D-LDH de la levure, qui est également capable d'oxyder d'autres α-hydroxyacides et en particulier le D-malate (Gregolin et coll., 1961). Pour cette raison, on a vérifié, par chromatographie sur papier (El Hawary et Thompson, 1953), que le produit de l'oxydation par l'enzyme stéréospécifique de la levure était bien le pyruvate et non l'oxalacétate ou un autre céto-acide. Par contre, les essais avec la L-LDH de muscle cardiaque

n'ont jamais donné de réaction positive.

2 - REDUCTION DU PYRUVATE PAR LES EXTRAITS BRUTS

L'oxydation du $NADH_2$ par les extraits bruts, en présence de pyruvate, a été mise en évidence et mesurée spectrophotométriquement à 340 mμ, suivant la technique décrite dans le Chapitre des Méthodes. La Fig. 6 montre que, en l'absence de pyruvate, les extraits ont une faible activité $NADH_2$-oxydase, mais que celle-ci est pratiquement négligeable par rapport à la vitesse d'oxydation du $NADH_2$ en présence de pyruvate.

Dans le cas des extraits obtenus à partir de cellules cultivées sur DL-lactate en aérobiose, l'activité varie entre 55 et 60 μ moles de $NADH_2$ oxydé ou de pyruvate réduit par heure et par mg d'azote protéique total. L'activité est très spécifique pour le $NADH_2$ et le pyruvate. Elle est nulle, en présence de $NADPH_2$ et lorsque le pyruvate est remplacé par l'α-cétobutyrate, l'α-cétovalérianate ou l'oxalacétate.

Il était important d'identifier le produit de la réduction du pyruvate à partir du $NADH_2$. En effet, A. aerogenes possède un système enzymatique qui conduit, à partir du pyruvate, à la formation du butanediol par une déshydrogénase à $NADH_2$ (Juni, 1952):

$$2(CH_3\text{-}CO\text{-}COOH) \xrightarrow{\text{condensation}} CO_2 + CH_3\text{-}CO\text{-}\underset{\displaystyle OH}{\overset{\displaystyle COOH}{\overset{|}{\underset{|}{C}}}}\text{-}CH_3 \quad \alpha\text{-acétolactate}$$

$$CH_3\text{-}CO\text{-}\underset{\displaystyle OH}{\overset{\displaystyle COOH}{\overset{|}{\underset{|}{C}}}}\text{-}CH_3 \xrightarrow{\text{décarboxylation}} CO_2 + CH_3\text{-}CO\text{-}CHOH\text{-}CH_3 \quad \text{acétoïne}$$

$$CH_3\text{-}CO\text{-}CHOH\text{-}CH_3 \xrightarrow{+\ NADH_2} CH_3\text{-}CHOH\text{-}CHOH\text{-}CH_3 \quad \text{butanediol}$$

Il était donc possible que l'oxydation du $NADH_2$ en présence du pyruvate soit due à l'action d'une butanediol-déshydrogénase.

Comme dans le cas des cultures, la formation exclusive de D-lactate a été vérifiée à l'aide de la D-LDH de levure. Dans ce but on a employé des systèmes contenant initialement l'extrait, 10 μ moles de pyruvate, 4 μ moles de $NADH_2$ et 120 μ moles de tampon phosphates (pH 7,3). Après 30 minutes d'incubation à 25°, la réaction est arrêtée par chauffage à 100° pendant 3 minutes et les protéines dénaturées éliminées par centrifugation. Le surnageant (2,15 ml) est placé dans une cuve en présence de 0,6 ml de ferricyanure et de 0,25 ml de D-LDH de levure. Les résultats (Fig. 7) montre que la pente de la droite est identique à celle obtenue avec un système contenant 8 μ moles de D-lactate à la place de l'échantillon.

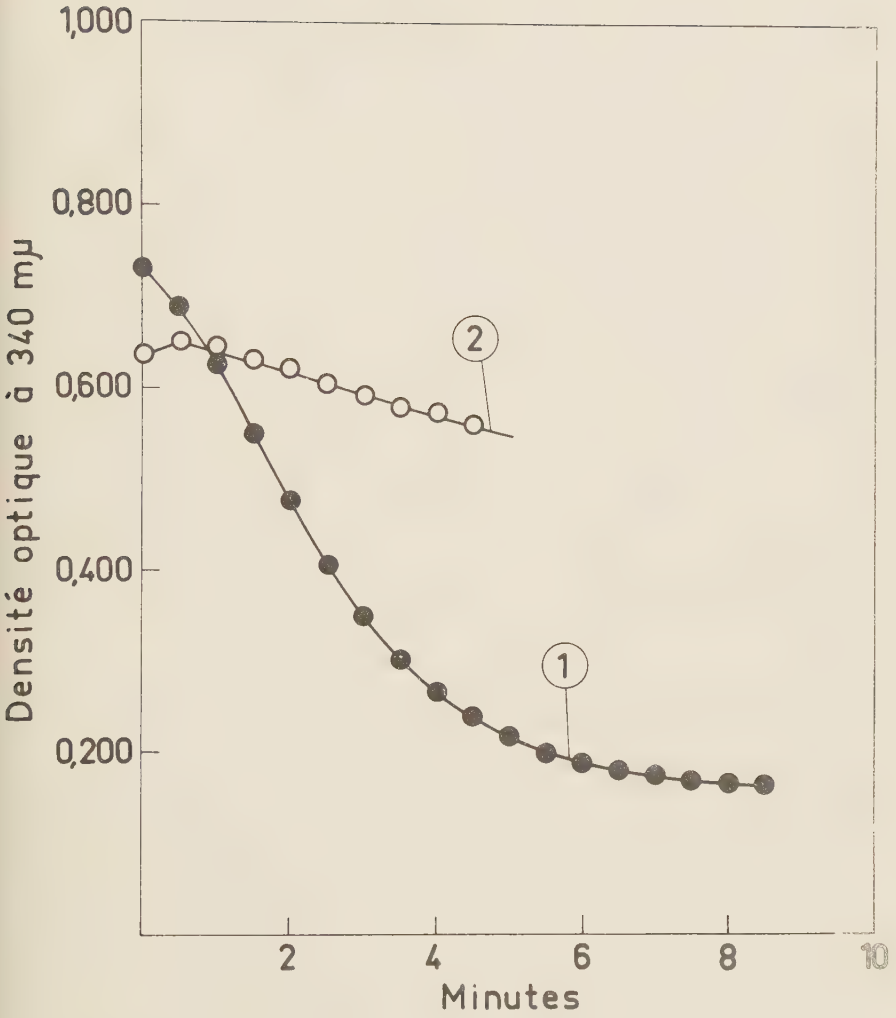


Fig. 6 - Oxydation du $NADH_2$ par le pyruvate en présence d'un extrait provenant d'une culture anaérobie sur glucose (0,078 mg d'azote protéique). Courbe (1) : système avec pyruvate. Courbe (2) : système identique où le pyruvate a été omis .

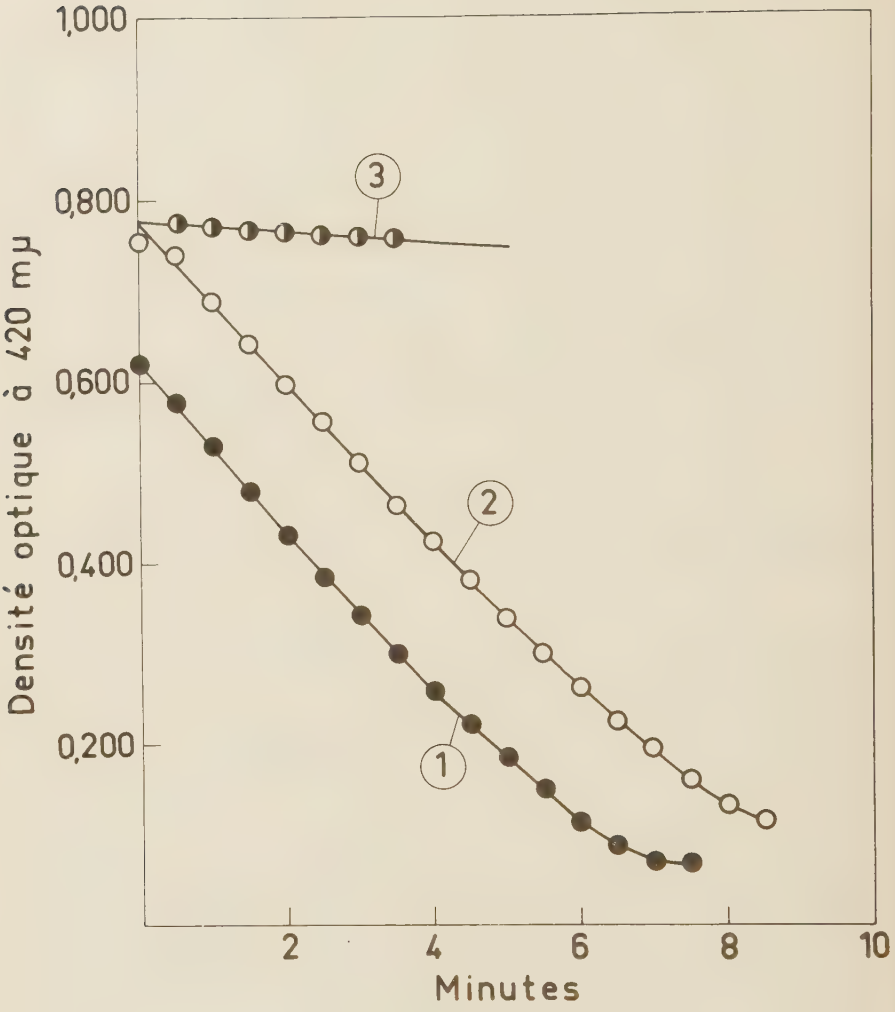


Fig. 7 - Caractérisation du D-lactate formé sous l'action de la pyruvate-réductase. Courbe (1) : système contenant l'échantillon. Courbe (2) : système contenant du D-lactate. Courbe (3) : système contenant l'échantillon provenant d'un essai où le $NADH_2$ a été omis.

TABLEAU IX

BILAN DE REDUCTION DU PYRUVATE PAR UN EXTRAIT D'A. AEROGENES EN PRESENCE D'UN EXCES DE $NADH_2$ (14 µmoles)

Pyruvate consommé (µmoles)	Lactate formé (µmoles)
2,28	2,24 (1)
5,5	5,7 (1)
10	10,6 (2)

(1) Dosage colorimétrique (Barker et Summerson, 1941).
(2) Dosage enzymatique par la D-LDH de levure (Labeyrie et coll., 1959).

D'autre part, on a procédé à une série de dosage du lactate formé dans des systèmes tamponnés à pH 6 et contenant initialement des quantités croissantes de Pyruvate et un large excès (14 µmoles) de $NADH_2$ (Tableau IX). Les résultats obtenus correspondent à une réduction stoechiométriquement totale du pyruvate en D-lactate, ce qui élimine la possibilité de la formation d'autres produits, et en particulier de butanediol, et correspond à l'équation :

$$CH_3\text{-}CO\text{-}COOH + NADH + H^+ \longrightarrow CH_3\text{-}CHOH\text{-}COOH + NAD^+$$

pyruvate — D-lactate

Une particularité intéressante de ce système enzymatique est son irréversibilité.

La réaction inverse, c'est-à-dire la réduction du NAD par les extraits en présence de D- ou de DL-lactate, a été recherchée spectrophotométriquement dans des systèmes contenant 20 µmoles de lactate, 2 µmoles de NAD et l'extrait (0,08 à 0,12 mg d'azote protéique). Ces essais ont été réalisés en tampon phosphates (pH 7 et 8), en tampon carbonate-bicarbonate (pH 9,2) et en tampon glycine-NaOH (pH 10). Les résultats ont été constamment et entièrement négatifs.

Afin d'élucider les raisons de cette irréversibilité, on a procédé à une purification de l'enzyme.

TABLEAU X

SCHEMA GENERAL D'UNE PURIFICATION DE LA PYRUVATE-REDUCTASE

	Activités totales	Activités spécifiques	Taux de purification	Rendement
Extrait brut	16 350	8		
30-45 % $(NH_4)_2SO_4$	34 700	45	5,6	220 %
Première chromatographie sur Sephadex G-100 (6 fractions)	1 085	106	13,3	
(7 fractions)	1 110	120	15	17,7 %
(8 fractions)	710	104	13	
Deuxième chromatographie sur Sephadex G-100 (5 fractions)	754	304	38	8,1 %
(6 fractions)	573	243	30,4	

La fraction précipitée par $(NH_4)_2SO_4$ est remise en solution dans, et dialysée contre, du tampon phosphates 0,033 M (pH 7,0). Les fractions 6, 7 et 8 de la première chromatographie sont passées de nouveau sur la colonne (deuxième chromatographie). Les activités totales sont exprimées en µmoles de pyruvate réduites en une heure, et les activités spécifiques en µmoles de pyruvate réduites en une heure par mg de protéines.

3 - PURIFICATION

La pyruvate-réductase d'A. aerogenes est un enzyme soluble, qui ne sédimente pas après 2 heures de centrifugation à 140 000 x g. Sa purification préliminaire a été obtenue par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium. L'enzyme se trouve dans la fraction protéique précipitée entre 30 et 45 % de saturation.

Lorsque ce précipité est remis en solution dans de l'eau distillée et dialysé, également contre de de l'eau distillée, l'activité spécifique est sensiblement double de celle des extraits bruts. Par contre, si au lieu d'eau distillée on emploie pour remettre en solution et pour dialyser, un tampon phosphates 0.033 M (pH 7,0), l'accroissement de l'activité spécifique atteint 5 à 6. D'autre part, l'activité totale de la préparation traitée dans ces dernières conditions est sensiblement deux fois plus grande que celle de l'extrait brut initial (Tableau X). Ce comportement est dû à une activation non spécifique de l'enzyme par les ions, ainsi que le démontrent les expériences suivantes.

Sur la Fig. 8, on a porté l'activité pyruvate-réductase d'un extrait brut incubé, préalablement aux essais, dans des solutions contenant des concentrations croissantes de KCl. D'autre part, on a procédé à une série de mesures d'activité (Tableau XI) avec un extrait brut préalablement incubé dans des solutions salines de constitutions différentes mais de même force ionique molaire ($\Gamma/2 = 0.2$). On voit que l'activation ne dépend pas de la nature du sel, et semble seulement dépendre de la force ionique. Pour $\Gamma/2 = 0,2$, elle est d'environ quatre fois par rapport à l'extrait témoin.

TABLEAU XI

ACTION DE DIFFERENTS SELS SUR L'ACTIVITE PYRUVATE-REDUCTASE

Sel	Activité
Néant (témoin)	0,170
NaCl	0,475
KCl	0,410
Na_2SO_4	0,440
$(NH_4)_2SO_4$	0,320
KNO_3	0,440

Conditions expérimentales identiques à celle de la Fig. 8
Concentrations salines uniformément ajustées à $\Gamma/2 = 0,2$.

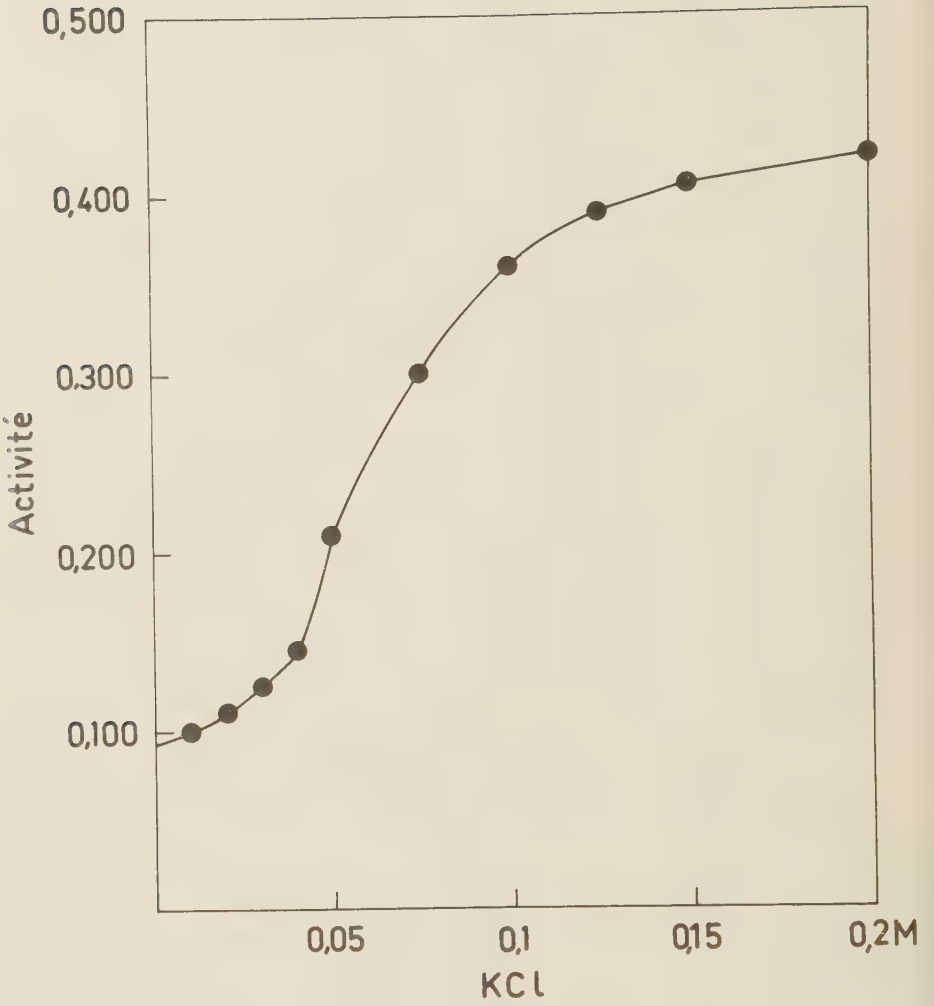


Fig. 8 - Activité pyruvate-réductase en fonction de la concentration en KCl. L'extrait (10 mg de protéines/ml) est mis à incuber avec du KCl pendant 30 minutes à 0°. On prélève 0,05 ml de ce mélange et on mesure son activité dans les conditions décrites dans le chapitre des Méthodes. L'activité est exprimée en variation de densité optique, à 340 mμ, en une minute.

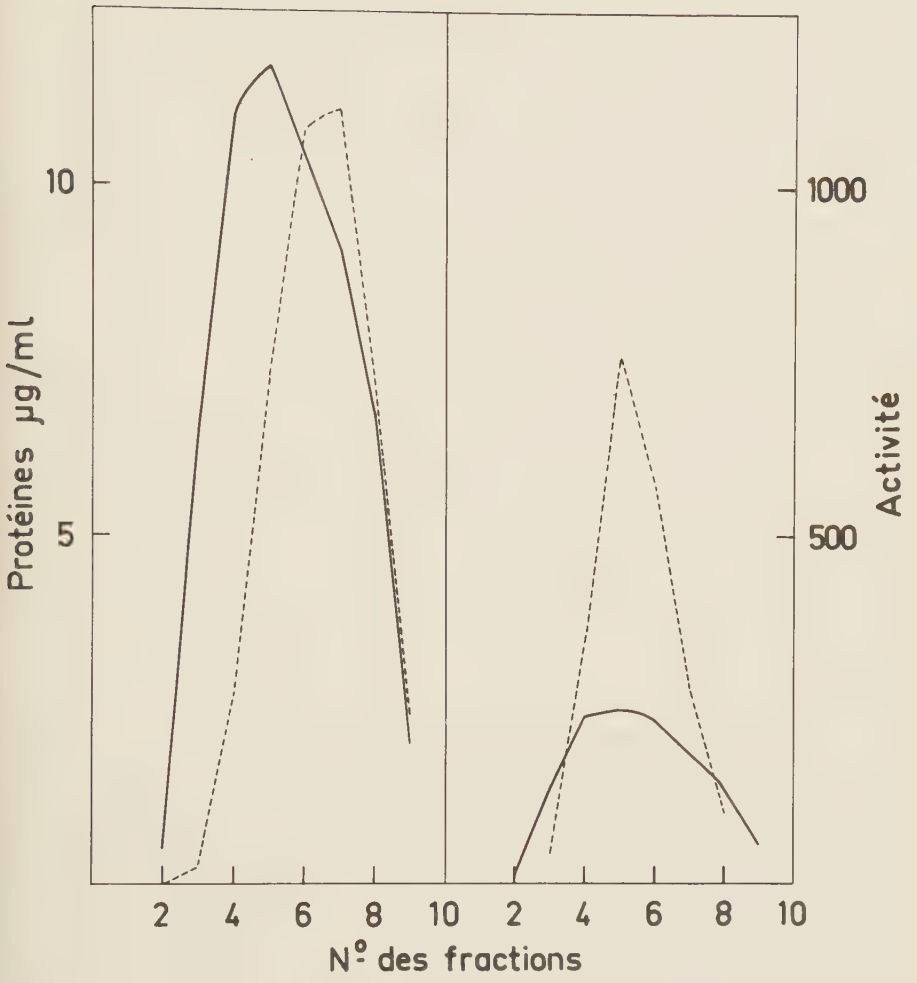


Fig. 9 - Double chromatographie de la pyruvate-réductase sur Sephadex G- 100. Colonne (54 x 1,5 cm) de Sephadex équilibrée avec du tampon phosphates 0,033 M (pH 7). Partie gauche : séparation de 152 mg de protéines précipitées entre 30 et 45 % de saturation de sulfate d'ammonium. Les fractions 6, 7 et 8 sont réunies et 9 mg de protéines sont passées à nouveau sur la colonne (partie droite). La courbe en traits pleins représente la quantité de protéines par ml d'éluat et celle en traits interrompus l'activité exprimée en µ moles de pyruvate réduites par heure et par ml d'éluat.

TABLEAU XII

CINETIQUE DE L'ACTIVATION DE LA PYRUVATE-REDUCTASE PAR KCl 0,2 M

Temps d'incubation	Activité
5 minutes	0,230
10 "	0,350
15 "	0,385
20 "	0,435
25 "	0,445
30 "	0,420
40 "	0,420

Conditions expérimentales identiques à celles de la Fig. 8

L'activation par les ions n'est pas instantanée, et n'atteint sa valeur maximale qu'au bout de 15 à 20 minutes (Tableau XII). Elle est, d'autre part, réversible : les préparations traitées par KCl 0,2 M, retrouvent leur activité initiale lorsque elles sont dialysées pendant 4 heures contre de l'eau distillée à +2°.

Un effet analogue des ions a été constaté sur l'activité de la ribonucléase pancréatique du oeuf (Dickman et Ring, 1958), de la protéinase, extraite de la peau de rat (Martin et Axelrod, 1958), et de la polynucléotide-phosphorylase de Micrococcus lysodeikticus (Beers, 1957). Tabeke et coll. (1963) ont constaté que la D-LDH à NAD de Leuconostoc mesenteroides est sensiblement activée par les ions Na^+ et K^+.

A de très faible concentrations, l'urée provoque également un accroissement d'activité (Tableau XIII) Mais l'action de cette substance est lente et n'atteint un effet maximal qu'après plusieurs heures d'incubation. L'enzyme ainsi traité n'est plus activé par les sels, ce qui montre que les deux effets ne sont pas additifs.

L'effet des ions sur l'activité enzymatique explique les résultats extrêmement inconstants et décevants des premiers essais de purification ultérieure de la pyruvate-réductase par chromatographie sur carboxyméthylcellulose (CMC) et sur diéthylaminoéthylcellulose (DEAE). Des résultats plus favorables ont été

TABLEAU XIII

ACTION DE L'UREE SUR L'ACTIVITE PYRUVATE-REDUCTASE

Concentration en urée	Activité
0	0,080
0,01 M	0,400
0,1 M	0,330
0,5 M	0,275

L'extrait (5 mg de protéines par ml) est mis à incuber avec la solution d'urée pendant 16 heures à 0°. On prélève 0,05 ml de ce mélange et on mesure son activité dans les conditions décrites dans le Chapitre des Méthodes. L'activité est exprimée en variation de densité optique, à 340 mμ, en une minute.

obtenus par filtration moléculaire à force ionique constante sur colonne de Sephadex G-100.

Le profil d'élution représenté sur la Fig. 9 montre que l'activité pyruvate-réductase est retardée par rapport à la masse principale des protéines. Les fractions actives, rassemblées après un premier passage, correspondent à une purification du même ordre, avec un rendement final de 8,1 % par rapport à l'extrait initial (Tableau X).

L'enzyme ainsi purifié est extrêmement instable et perd irréversiblement 75 % de son activité en une nuit, à + 2°, ce qui a empêché de pousser au-delà la purification. On a essayé sans succès de protéger l'enzyme par addition de ses substrats, c'est-à-dire par l'addition de pyruvate, de D-lactate, de NAD et de $NADH_2$ à la concentration 10^{-3} M.

4- CAUSE DE L'IRREVERSIBILITE APPARENTE

La réversibilité de la réaction catalysée par les lactate-déshydrogénases à pyridine-nucléotides des bactéries a été établie expérimentalement dans plusieurs cas, notamment pour les D-LDH de L. mesenteroides (Dennis, 1962 ; Tabeke et coll., 1963), la L-LDH de Bacillus subtilis (Yoshida, 1965), et les D- et L-LDH de Lactobacillus plantarum (Dennis et Kaplan, 1960).

Il convient de souligner que, d'une manière générale la réversibilité des lactate-déshydrogénases à pyridine-nucléotides ne peut être mise en évidence qu'à des pH fortement alcalins, c'est-à-dire, dans des conditions vraisemblablement non physiologiques.

En effet, la variation standard d'énergie libre du couple pyruvate - $NADH_2$:

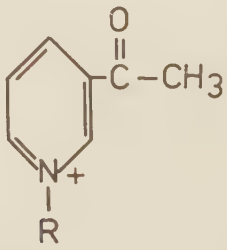
$$CH_3\text{-}CO\text{-}COOH + 2H^+ + 2\,e \rightleftharpoons CH_3\text{-}CHOH\text{-}COOH$$

$$NADH + H^+ \rightleftharpoons NAD^+ + 2H^+ + 2\,e$$

$$CH_3\text{-}CO\text{-}COOH + NADH + H^+ \rightleftharpoons CH_3\text{-}CHOH\text{-}COOH + NAD^+$$

est, à pH 7, $\Delta F'_o = 6{,}45$ Kcal/mole ; ce qui correspond à une constante d'équilibre $K = 5{,}43.10^4$, de telle sorte qu'en milieu neutre la réduction du pyruvate est très fortement favorisée par rapport à la réaction inverse. Cependant, l'oxydation du NAD réduit s'accompagnant de l'échange d'un seul proton, alors que la réduction du pyruvate en comporte deux, les pH alcalins tendent à diminuer la différence de potentiel entre les deux systèmes et, corrélativement, à favoriser la réaction inverse. C'est ainsi qu'à pH 10, la variation d'énergie libre et la constante d'équilibre prennent respectivement les valeurs $\Delta F'_o = -2{,}3$ Kcal/mole et $K = 49{,}1$, ce qui permet de mettre expérimentalement en évidence une réduction du NAD par l'enzyme en présence de lactate.

Ces considérations thermodynamiques ont conduit Kaplan et Ciotti (1956 a, 1956 b) à rechercher systématiquement des analogue structuraux des pyridine,-nucléotides ayant des potentiels d'oxydoréduction moins électro négatifs que le NAD et le NADP et pouvant, de ce fait, être utilisés pour démontrer à des pH plus voisins de la neutralité la reversibilité des déshydrogénases à pyridine-nucléotides. Parmi ces analogues structuraux, le 3-acétyl-pyridine-adenine-dinucléotide (AcPyAD) :



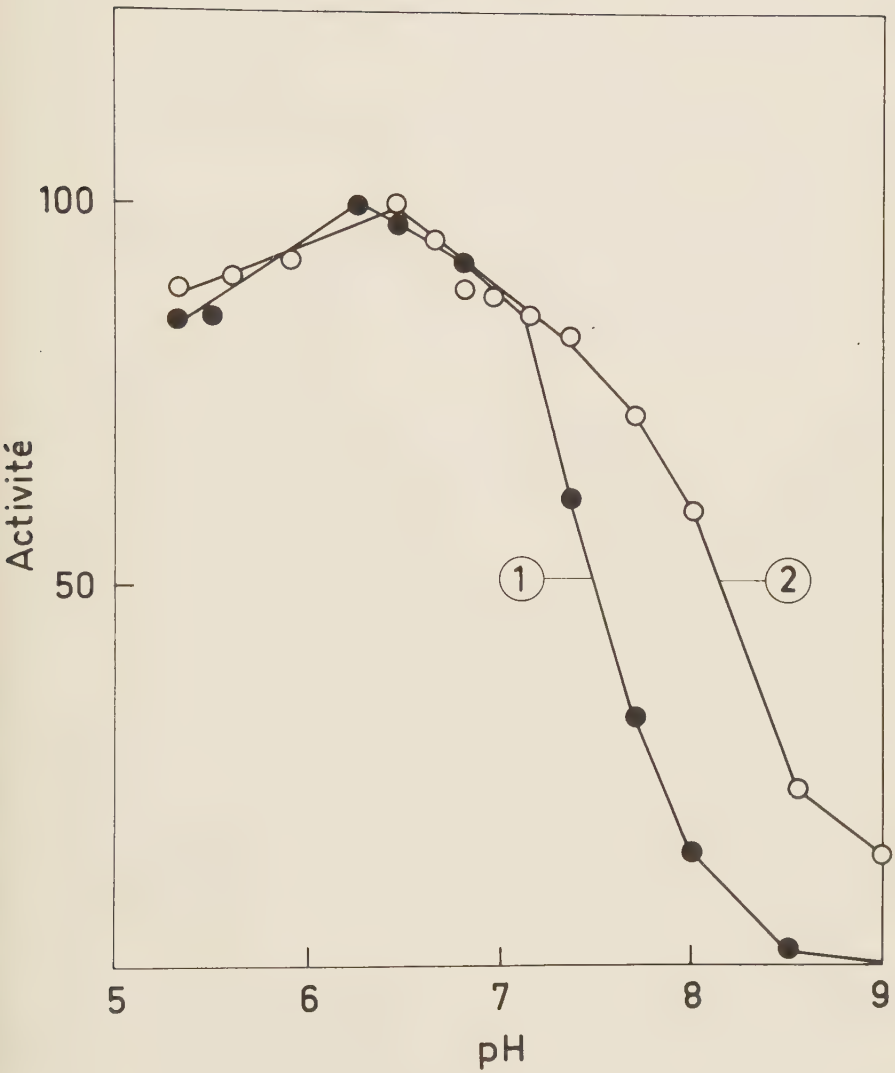


Fig. 10 - Activités des pyruvate-réductases en fonction du pH. pH 5,3 à 8 : tampon phosphates, 66 µ moles ; pH 8 à 9 : tampon Tris-HCl, 100 µ moles. Courbe (1) : extrait A. aerogenes ayant une activité spécifique maximale de 205. Courbe (2) : extrait L. mesenteroides, ayant une activité spécifique maximale de 5.040.

présente à pH 7 un potentiel standard de -0,248 Volt, c'est-à-dire supérieur de + 0,072 V à celui du coenzyme naturel. Cette substance a été utilisée par Kaplan et son groupe pour l'étude de l'alcool-déshydrogénase, de la lactate-déshydrogénase et de la glutamate-déshydrogénase des mammifères.

Dans le cas d'A. aerogenes, on pouvait penser à priori que l'irréversibilité de la pyruvate réductase n'était qu'apparente et liée à une inactivation de l'enzyme dans la gamme alcaline de pH où la réversibilité de la réaction peut être observée expérimentalement.

Pour vérifier cette hypothèse, on a comparé l'activité en fonction du pH, de la pyruvate-réductase d'A. aerogenes et de D-LDH à NAD de Leuconostoc mesenteroides dont la réversibilité avait déjà été établie par Dennis (1962). Ce dernier enzyme a été extrait et partiellement purifié à partir de cellules de L. mesenteroides cultivées en anaérobiose, sur un milieu contenant des peptones, de l'extrait de levure (Difco) et du glucose, à 24°, pendant 48 heures. Les extraits ont été préparés suivant la technique décrite par Dennis (1962).

Les résultats sont rapportés sur la Fig. 10. On voit que les deux courbes d'activité en fonction du pH sont pratiquement confondues entre pH 5,3 et pH7,2. A partir de cette dernière valeur, la pyruvate-réductase d'A. aerogenes est rapidement inactivée par l'alcalinisation du milieu. A pH 8,0, elle ne représente plus que 13 % de l'activité maximale et s'annule à pH 8,5. Par contre, la D-LDH de L. mesenteroides demeure active dans cette gamme de pH et, à pH 8,5, conserve encore 23 % de son activité maximale.

En outre, la différence de comportement des deux enzymes à l'égard du pH est rendue encore plus sensible par le fait que, dans les extraits étudiés, l'activité spécifique de la pyruvate-réductase est environ 20 fois moins élevée que celle de la D-LDH de L. mesenteroides.

Ces observations indiquent que, dans les conditions où la déshydrogénation du lactate peut être mise en évidence, la pyruvate-réductase d'A. aerogenes est entièrement inactivée.

On pouvait penser qu'en remplaçant le NAD par son dérivé acétylé (AcPyAD), la réversibilité de la réaction catalysée par la pyruvate-réductase puisse être mise en évidence à un pH où l'enzyme n'est pas encore totalement dénaturé. Ces essais ont été effectués à pH 7,5, dans des systèmes contenant 0,75 µmole d'AcPyAD, et une quantité très élevée d'enzyme (3,5 mg de protéines totales). La réaction a été suivie spectrophotométriquement à 365 mµ, longueur d'onde qui, dans le cas de l'AcPyAD, correspond au maximum d'absorption de la forme réduite.

Les résultats de ces expériences (Fig. 11) montrent que, dans ces conditions, la pyruvate-réductase fonctionne réversiblement, à un taux mesurable. La réaction est spécifique pour le D-lactate, et la légère réduction de l'accepteur

relevée en présence de L-lactate est certainement due à une faible contamination de celui-ci par son antipode optique

5 - DISCUSSION

La pyruvate-réductase d'*A. aerogenes* explique l'accumulation de D-lactate dans les cultures de cet organisme.

Cet enzyme présente une analogie évidente avec ceux qui sont responsables de la formation de lactate par les bactéries lactiques. Parmi celles-ci un certain nombre forment exclusivement, comme *A. aerogenes*, du D-lactate Ce cas est notamment celui des bactéries hétérolactiques appartenant au genre *Leuconostoc*, et de plusieurs bactéries homolactiques (*Lactobacillus caucasicus* *L. lactis* et *L. leichmanii*).

L'enzyme d'*A. aerogenes* présente cependant plusieurs particularités intéressantes. Son niveau dans les cellules est relativement faible par rapport à celui des bactéries lactiques. L'activité des extraits bruts d'*A. aerogenes* est en moyenne, de 8 à 10 µmoles de pyruvate réduit par heure et par mg de protéines, alors que, chez *Leuconostoc mesenteroides*, elle atteint environ 150 (Tabeke et coll. 1963). D'autre part, l'enzyme d'*A. aerogenes* présente une irréversibilité apparente, qui nous paraît justifier la qualification de pyruvate-réductase.

Comme on l'a vu au paragraphe précédent, cette irréversibilité est due à l'instabilité particulièrement marquée de l'enzyme, dans les milieux alcalins. Cependant, les considérations thermodynamiques, qui ont été précédemment exposées, suggèrent que, d'une manière tout à fait générale, les lactate-déshydrogénases à NAD ont essentiellement, si ce n'est exclusivement, une fonction pyruvate-réductase. En d'autres termes, il semble que l'irréversibilité apparente de l'enzyme d'*A. aerogenes* ne représente qu'un cas extrême d'une irréversibilité fonctionnelle, qui est la règle générale.

Il est vraisemblable que la pyruvate-réductase d'*A. aerogenes* a un rôle d'oxydoréduction et, en anaérobiose, participe à la réoxydation du $NADH_2$ Toutefois, il convient de faire, à ce sujet, les remarques suivantes Chez *A. aerogenes*, à la différence des bactéries lactiques, la réduction du pyruvate en lactate ne constitue pas la voie prédominante ou exclusive de la réoxydation des pyridine-nucléotides. Cet organisme fermente le glucose simultanément par la glycolyse qui aboutit à la formation du $NADH_2$, et par la voie des pentose-phosphates, dont les déshydrogénases fonctionnent avec le NADP. Ce dernier coenzyme est totalement inactif, comme nous l'avons établi, avec la pyruvate-réductase. De plus, le $NADH_2$ provenant de la glycolyse est principalement réoxydé par un autre mécanisme, consistant dans la décarboxylation du pyruvate en acétyl-phosphate et la réduction de celui-ci en éthanol, qui s'accumule dans le milieu en quantités

5 fois plus élevée que le lactate (Altermatt et coll. 1955).

Enfin A. aerogenes est également capable de réoxyder le $NADH_2$ par la butanediol-déshydrogénase, dont il a déjà été fait mention.

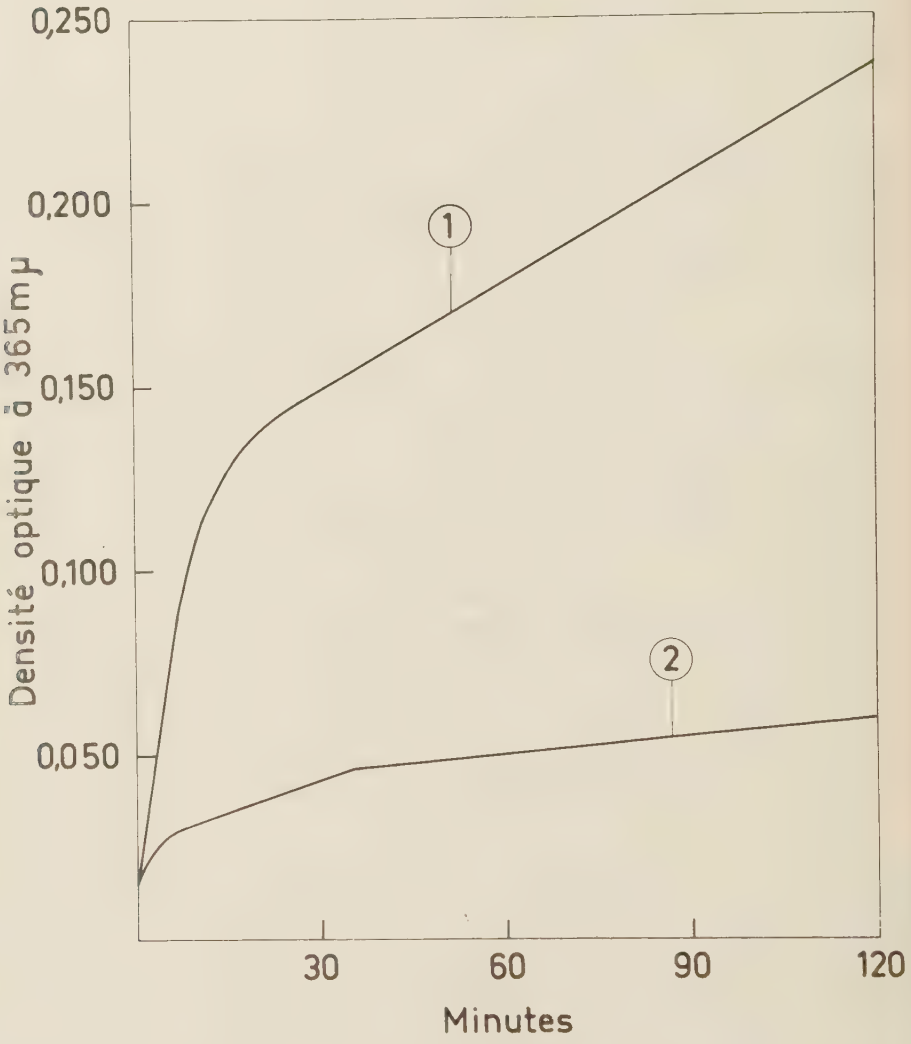


Fig. 11 - Réduction de l'Ac Py AD par le lactate en présence d'un extrait purifié. Conditions expérimentales : Ac Py AD, 0,75 μ moles ; lactate 20 μ moles ; tampon Tris-HCl (pH 7,5), 100 μ moles ; extrait, 0,2 ml (3,5 mg de protéines) ; volume total, 3 ml. Courbe (1) : D - lactate; Courbe (2) : L-lactate.

Chapitre IV

REGULATION DES D-ET L-LACTATE-DESHYDROGENASES ET DE LA PYRUVATE - REDUCTASE D'AEROBACTER AEROGENES

1- PYRUVATE-REDUCTASE

On a systématiquement mesuré l'activité pyruvate-réductase d'extraits bruts obtenus à partir de bactéries cultivées dans différentes conditions. Ces cultures ont été réalisées en aérobiose sur succinate, glucose, DL-, L- et D- lactate , et en anaérobiose, dans des milieux contenant ou non du nitrate.

Les résultats de ces mesures (Tableau XIV) montrent que la pyruvate - réductase est formée dans toutes les conditions de croissance considérées. Les activités spécifiques des extraits bruts sont proches les unes des autres, et leurs valeurs ne sont pas suffisamment différentes pour qu'on puisse en tirer des conclusions quant à l'influence relative des divers substrats sur le niveau de l'enzyme dans les cellules. Il convient, cependant, de souligner que les extraits des cellules cultivées en aérobiose ou en anaérobiose ont des activités pratiquement identiques. Ce fait distingue la pyruvate-réductase de la butanediol-déshydrogénase du même organisme, qui est exclusivement formé en anaérobiose (Pichinoty, 1965).

Nos observations concordent avec celles d'Altermatt et coll. (1955) qui ont constaté l'accumulation constante d'acide lactique dans les cultures d'A aerogenes, sur glucose et sur allose, aussi bien en aérobiose qu'en anaérobiose.

Le comportement de la pyruvate-réductase est celui d'un enzyme qui est soit "constitutif", au sens rigoureux du terme, soit induit par un produit du métabolisme formé dans toutes les conditions de culture employées. Cette dernière éventualité doit évidemment être prise en considération, du fait que le substrat de l'enzyme, c'est-à-dire le pyruvate, appartient au métabolisme intermédiaire de toutes les substances utilisées comme source de carbone.

2 - D- ET L-LACTATE-DESHYDROGENASES

a) Formation des deux enzymes dans les cellules cultivées sur lactate en aérobiose

On a déjà signalé, au début du Chapitre II, qu' Aerobacter aerogenes

TABLEAU XIV

ACTIVITE PYRUVATE-REDUCTASE D'EXTRAITS DE BACTERIES CULTIVEES DANS DIFFERENTES CONDITIONS

Conditions de culture	Activité
Aérobiose	
Glucose (1 g/l)	(221) (385
Succinate (1 g/1)	117
DL-lactate (2 g/l)	(59) (55
D- lactate (0,5 g/l)	32
L-lactate (0,5 g/l)	64
Glucose (1 g/l) + DL-lactate (0,7 g/l)	135
Anaérobiose	
Glucose (2 g/l)	(95) (59
Glucose (2 g/l) + DL-lactate (0,7 g/l)	88
Glucose (2 g/l) + nitrate (5 g/l)	118

Les activités sont exprimées en µmoles de pyruvate réduites par heure et par mg d'azote protéique.

TABLEAU XV

ACTIVITES D-LDH ET L-LDH D'EXTRAITS OBTENUS A PARTIR DE CELLULES CULTIVEES EN AEROBIOSE

Conditions de culture	Activités	
	D-LDH	L-LDH
DL-lactate racémique (2 g/l)	(23)	15
	(18	9
D-lactate (0,5 g/l) + L-lactate (0,5 g/l)	57	29
L-lactate (0,5 g/l)	35	28
D-lactate (0,5 g/l)	(31)	25
	(31	33
Glucose (1 g/l)	(26)	1,5
	(15	3 (0) (1)

(1) Activité mesurée en présence d'oxalate 10^{-3} M

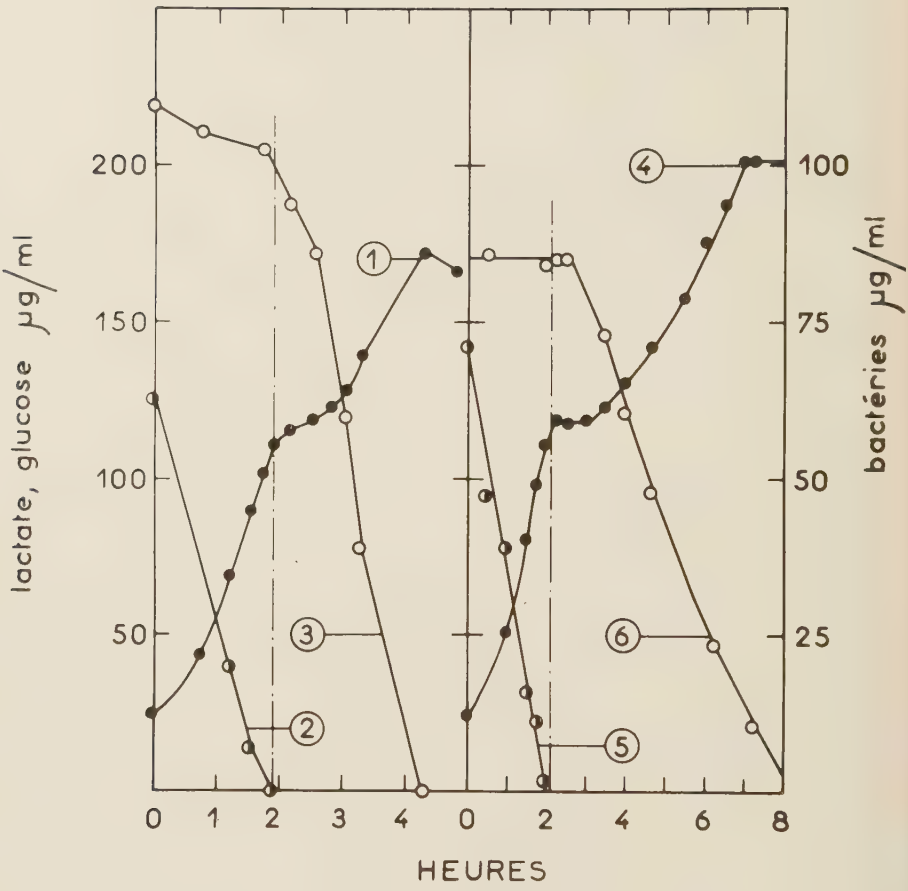


Fig. 12 - Croissance aérobie, à 37°, sur un mélange de glucose et de L-lactate (partie gauche) ou de glucose et de D-lactate (partie droite). Les concentrations des aliments carbonés, sont exprimées en µg d'acide lactique ou de glucose par ml. Courbes (1) et (4) : bactéries. Courbes (2) et (5) : glucose. Courbe (3) : L-lactate. Courbe (6) : D-lactate.

ne se développe sur milieux contenant du lactate comme substrat carboné qu'en aérobiose. Les extraits obtenus à partir de ces cultures contiennent toujours simultanément la D-LDH et la L-LDH, que les organismes aient été cultivés sur DL-, sur D- ou L-lactate (Tableau XV).

b) Formation des enzymes dans les cultures aérobies sur glucose seul

Le Tableau XV montre, d'autre part, que les extraits de cellules cultivées en aérobiose dans des milieux où le glucose est la seule source de carbone ont une activité D-LDH identique à celle des cellules cultivées sur D- ou L-lactate. Ce fait indique que la D-LDH est soit de nature "constitutive", soit induite par le D-lactate endogène. En effet, il convient de rappeler que la pyruvate-réductase d'A. aerogenes est toujours présente dans les cellules, quelles que soient les conditions de croissance, de telle sorte que les organismes, dans tous les cas, produisent et contiennent du D-lactate formé par cet enzyme.

Par contre, les bactéries cultivées sur glucose ne possèdent par ou très peu d'activité L-LDH. La faible activité constatée en présence de L-lactate est complètement annulée lorsqu'on opère en présence d'oxalate 10^{-3}M, substance dont on a déjà indiqué qu'elle inhibe spécifiquement la D-LDH. En conséquence, l'activité mesurée en présence de L-lactate est un artefact, dû à la contamination de cette forme stéréospécifique par des traces de son antipode optique (1 à 2 %) qui sont présentes dans les échantillons commerciaux. En d'autres termes, l'activité L-LDH des cellules cultivées sur glucose est nulle.

Une autre particularité intéressante de l'activité L-LDH est que celle-ci n'apparaît pas secondairement dans les cellules cultivées sur glucose et mises en suspension non proliférante en présence de lactate. Ce fait a été établi de la manière suivante. Les bactéries cultivées sur glucose ont été récoltées par centrifugation, lavées, et remises en suspension (190 mg, poids sec) dans 100 ml de tampon phosphates 0,033 M (pH 7,0), contenant 450 mg de L- ou de DL- lactate. La préparation a été incubée pendant 4 heures, à 37°, dans des conditions où l'aérobiose était assurée par barbotage d'air. Les extraits préparés à partir des bactéries ainsi traitées sont totalement dépourvus d'activité L-LDH.

Il résulte de ces observations et du fait que les cellules cultivées sur L- ou D-lactate possèdent l'activité L-LDH, que cet enzyme est soit inductible, mais induit non spécifiquement par les deux énantiomorphes, soit réprimé par le glucose.

c) Effet du glucose sur la synthèse et sur l'activité des LDH

Afin d'étudier l'influence du glucose sur la biosynthèse des LDH, A. aerogenes a été cultivé en aérobiose, dans des milieux contenant un mélange de glucose (125 µg/ml) et de D-lactate (175 µg/ml) ou de L-lactate (210 µg/ml). Dans ces cultures, on a mesuré, parallèlement à la croissance, la consommation du glucose et du lactate.

Les résultats (Fig. 12) montrent que, dans les deux milieux mixtes, les courbes de croissance sont de type diauxique et que leurs phases initiales correspondent à une utilisation préférentielle du glucose. On doit noter, cependant, que, dans les cultures sur glucose et L-lactate, ce dernier est lentement consommé pendant la première phase de la croissance diauxique, tandis que, dans l'autre milieu, la concentration du D-lactate demeure rigoureusement inchangée jusqu'à l'épuisement complet du glucose.

On a, d'autre part, mesuré les activités LDH d'extraits préparés à partir de cellules prélevées au cours des deux phases de ces croissances. Ces mesures (Tableau XVI) mettent en évidence un comportement différent des deux enzymes.

Le niveau de la L-LDH est faible dans les cellules cultivées sur L-lactate, et prélevées pendant l'utilisation préférentielle du glucose. Au cours de cette phase, sa valeur correspond à environ 25 % de celle qui est atteinte dans la deuxième phase de la croissance après le palier diauxique. L'enzyme synthétisé au cours de la première phase rend compte de la période de croissance lente qui suit immédiatement l'épuisement du glucose et qui précède l'acquisition par les cellules de leur activité L-LDH maximale. Ce comportement est caractéristique d'une répression catabolique par le glucose ("effet glucose"), ayant pour conséquence d'inhiber de 75 % environ la biosynthèse de l'enzyme.

La L-LDH étant normalement synthétisée en présence de D-lactate aussi bien que de L-lactate, et à des niveaux cellulaires semblables avec l'un ou l'autre de ces inducteurs, on pourrait s'attendre à ce que dans les milieux mixtes contenant du glucose, l'enzyme soit formé au cours de la seconde phase des croissances diauxiques, quelle que soit la forme du lactate présente dans le milieu. Toutefois, le Tableau XVI montre que, dans les cellules cultivées sur glucose et D-lactate, le niveau de la L-LDH demeure très faible, même pendant le seconde phase de la croissance diauxique, c'est-à-dire lorsque tout le glucose initial a été consommé. Dans ces cultures, tout se passe comme si le D-lactate, mais non le L-lactate, était incapable d'induire la biosynthèse de la L-LDH par les cellules préalablement développées sur glucose, ou, tout au moins, ne conduisait qu'à la synthèse d'une quantité d'enzyme ne dépassant pas le quart environ de celle induite par le L-lactate dans les mêmes conditions. En d'autres termes, une préculture sur glucose a pour conséquence de conférer à l'induction de la L-LDH une stéréospécificité d'inducteur qui n'existe pas dans le cas des cellules cultivées uniquement sur lactate. Le mécanisme de ce phénomène n'a pu être précisé.

On a déjà vu que, dans les cultures sur glucose et D-lactate, ce dernier n'est pas métabolisé au cours de l'utilisation préférentielle du glucose. Cependant les extraits des bactéries prélevées pendant cette phase possèdent une activité D-LDH aussi élevée que ceux des cellules prélevées en fin de développement de la culture.

Afin de préciser le déterminisme de ce comportement, on a procédé à

TABLEAU XVI

ACTIVITES D-LDH ET L-LDH D'EXTRAITS OBTENUS A PARTIT DE CULTURES DIAUXIQUES SUR MELANGE DE GLUCOSE (1 g/l) ET DE D- OU L-LACTATE (0,25 g/l), à 37°

Conditions de culture		Activités	
		D-LDH	L-LDH
Glucose + L-lactate	Première phase de la croissance	46	6
	Deuxième phase de la croissance	46	23,5
Glucose + D-lactate	Première phase de la croissance	58	4,5
	Deuxième phase de la croissance	39,5	6

des cultures aérobies en milieux contenant comme seul substrat carboné du D- ou du L-lactate. Au cours de la phase exponentielle de la croissance, du glucose (125 µg/ml) est ajouté aux cultures. On constate (Fig. 13) que l'addition de glucose ne modifie aucunement la vitesse de consommation du L-lactate par les cellules en cours de développement sur ce substrat. Par contre, l'addition de glucose exerce immédiatement sur la consommation de D-lactate dans la culture correspondante, une inhibition totale qui persiste jusqu'à la disparition complète du glucose. Ces observations montrent que le glucose n'a aucun effet sur le fonctionnement de la L-LDH préformée, mais inhibe instantanément celui de la D-LDH.

Le même phénomène s'observe avec les suspensions non proliférantes. L'expérience de la Fig. 14 a été réalisée avec une suspension de bactéries lavées et provenant d'une culture aérobie sur glucose. Ces cellules, mises en présence à la fois de glucose et de D-lactate, ne métabolisent que le glucose. Par contre, mises en présence de D-lactate seul, elles métabolisent immédiatement celui-ci à vitesse constante.

L'activité D-LDH des extraits contenant cet enzyme n'est inhibée in vitro ni par le glucose, ni par une série de substances appartenant au métabolisme intermédiaire du glucose (glucose-6-phosphate, fructose-6-phosphate, fructose-1,6-diphosphate, glyceraldéhyde-3-phosphate et 3-phosphoglycérate). Ces composés ont été employés à une concentration uniforme $5\ 10^{-3}$M. Par contre le phosphoénolpyruvate à la même concentration inhibe 60 % de l'activité D-LDH et 30 %

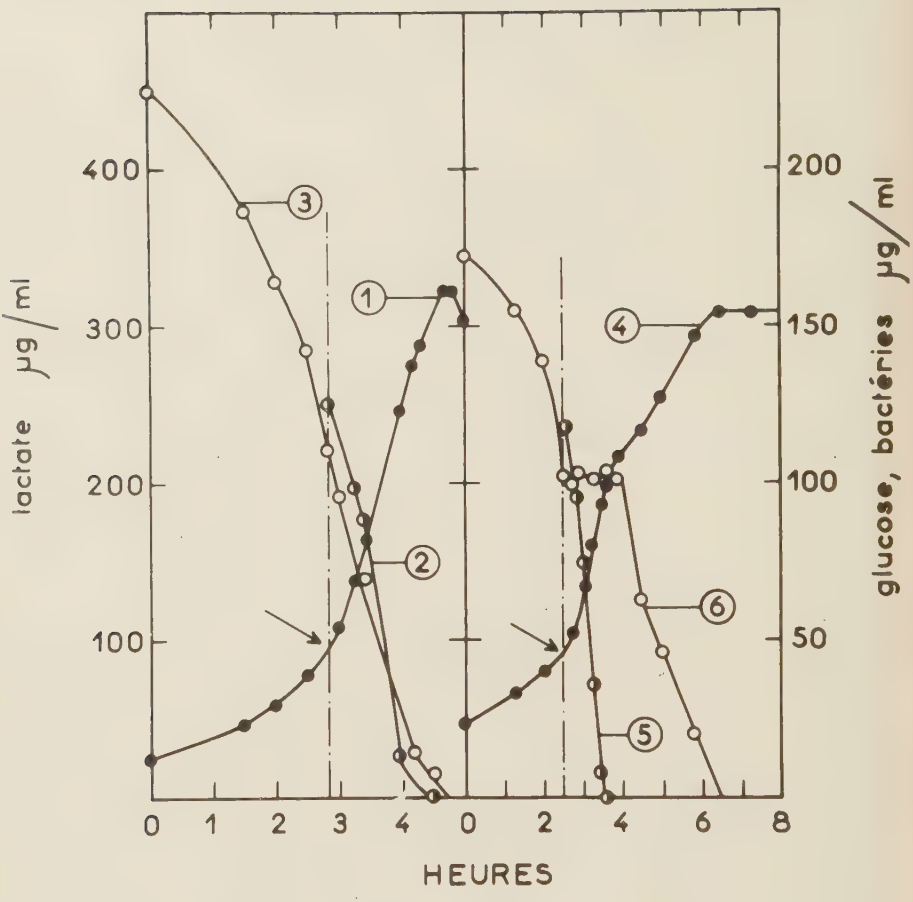


Fig. 13 - Croissance aérobie, à 37°, sur L-lactate (partie gauche) ou sur D-lactate (partie droite), avec addition de glucose aux cultures en phase exponentielle, à l'instant indiqué par la flèche. Les concentrations des aliments carbonés sont exprimées en µg d'acide lactique ou de glucose par ml. Courbes (1) et (4) : bactéries. Courbes (2) et (5) : glucose. Courbe (3) : L-lactate. Courbe (6) : D-lactate.

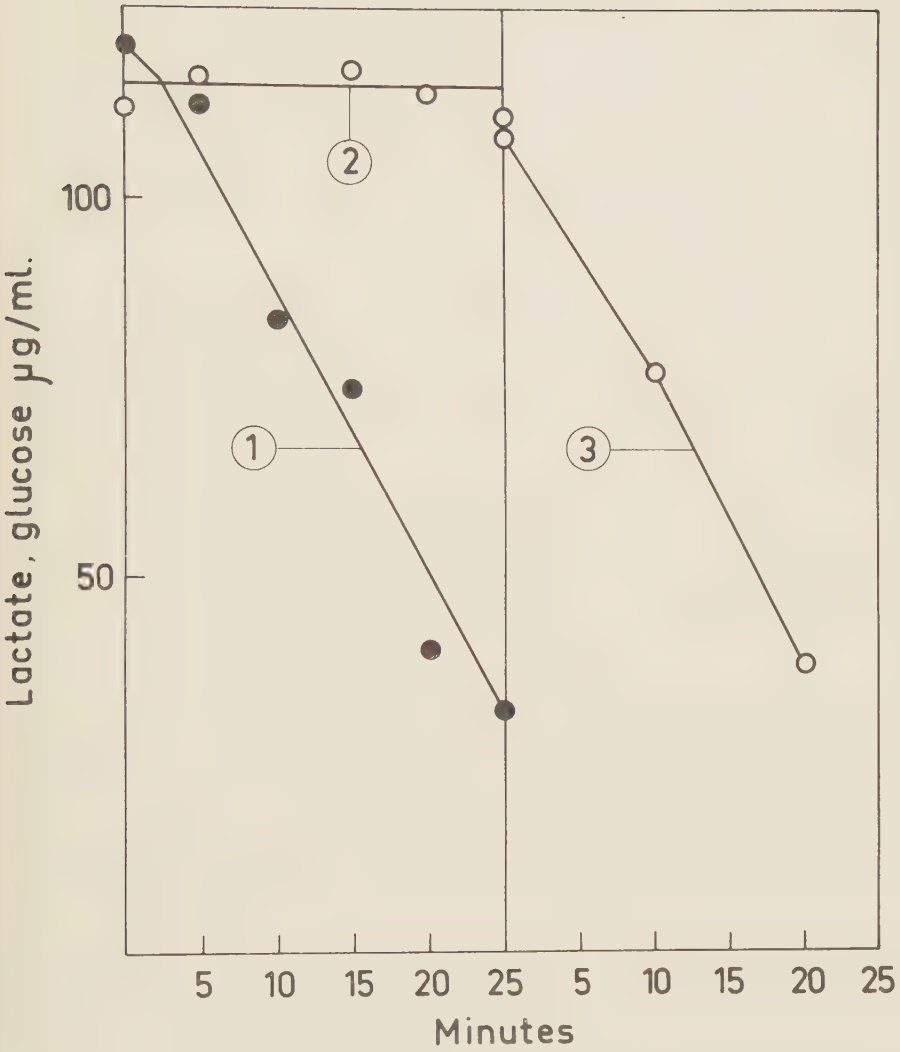


Fig. 14 - Oxydation du D-lactate en présence (partie gauche) et en l'absence de glucose (partie droite) par des suspensions non proliférantes provenant d'une culture aérobie sur glucose. Conditions expérimentales : tampon phosphates (pH 7), 66 µ moles/ml ; bactéries, 150 µg/ml ; chloramphénicol, 5 µg/ml ; volume total 50 ml dans des fioles d'erlenmeyer agitées à 37°. Courbe (1) : glucose. Courbes(2) et (3) : lactate.

de l'activité L-LDH. Le pyruvate lui-même à la concentration 10^{-2}M inhibe 65% de l'activité D-LDH et 76% de l'activité L-LDH. A cause de leur caractère non spécifique, ces inhibitions ne semblent pas pouvoir expliquer l'effet du glucose sur l'activité D-LDH des cultures et des suspensions non proliférantes. L'absence d'inhibition *in vitro* de l'enzyme par le glucose et ses intermédiaires métaboliques rend peu vraisemblable un effet allostérique (Monod et coll. 1963) sur la D-LDH. En définitive, il est possible que l'effet du glucose s'exerce, non pas sur la D-LDH elle-même, mais sur un système de perméation propre au D-lactate. Cette hypothèse reste cependant à vérifier.

d) Influence d'autres substrats carbonés sur la synthèse des LDH

Le Tableau XVII montre les activités D-LDH et L-LDH d'extraits obtenus à partir de bactéries cultivées en aérobiose dans des milieux où la seule source de carbone était constituée par du pyruvate, du citrate ou du succinate à concentration uniforme de 1 g par litre.

Les résultats de ces mesures indiquent que, dans tous les cas, les cellules cultivées sur ces différents substrats possèdent une activité D-LDH semblable à celle des cellules cultivées sur DL-lactate ou sur glucose, ce qui confirme le caractère "constitutif" de l'enzyme. Par contre, ces extraits n'ont aucune activité L-LDH, ce qui confirme le caractère inductible de cet enzyme.

L'absence de L-LDH dans les cellules cultivées sur pyruvate est une constatation importante. Elle élimine, en effet, la possibilité que cet enzyme soit induit, non par son substrat, mais par le pyruvate, produit commun des réactions catalysées par les deux LDH ; une telle hypothèse aurait, en effet pu expliquer que la L-LDH soit formée aussi bien dans les cultures sur D-lactate que dans celles sur L-lactate. Corrélativement, ces expériences démontrent que la L-LDH est induite non spécifiquement par l'un et l'autre des deux énantiomorphes du lactate.

D'autre part, les extraits obtenus à partir des bactéries cultivées sur un milieu contenant du succinate additionné de 1 % de L-lactate sont dépourvus d'activité L-LDH. Ce fait élimine l'hypothèse selon laquelle le pouvoir inducteur du D-lactate serait dû aux traces d'antipode L présentes dans les échantillons commerciaux utilisés.

Il convenait de s'assurer que l'acquisition de l'activité L-LDH en présence de L-lactate est bien un processus d'adaptation enzymatique et ne consiste pas dans une sélection de mutants. Ceci a été vérifié de la façon suivante. Une culture aérobie sur glucose a été fortement diluée (10^{-5}) avec NaCl à 0,2 %, de façon à contenir environ 2 500 cellules viables par ml, et un aliquot (0,1 ml) de cette dilution a été ensemencé sur milieux gélosés contenant comme substrat du glucose, du L-lactate ou du D-lactate. Les résultats moyens des numérations sur ces trois milieux ont été respectivement de 213, 277 et 283 colonies, ce qui

TABLEAU XVII

ACTIVITES D-LDH ET L-LDH DES EXTRAITS DE CELLULES CULTIVEES EN AEROBIOSE SUR DIFFERENTS SUBSTRATS CARBONES

Substrat	Activités	
	D-LDH	L-LDH
Pyruvate (1 g/l)	(29)	5 (0) (1)
	(39)	0
Citrate (1 g/l)	(29)	6
	(27)	1
Succinate (1 g/l)	(23)	2
	19	1,4
Succinate (1 g/l) + L-lactate (0,01 g/l)	27	1,1

(1) Activité mesurée en présence d'oxalate 10^{-3} M

montre que toutes les cellules ont acquis l'activité L-LDH et qu'il s'agit bien d'une adaptation enzymatique.

Sur le Tableau XVIII sont rassemblées les activités spécifiques D-LDH et L-LDH d'extraits obtenus à partir de cultures en milieux contenant à la fois du D- ou du L-lactate (0,25 g/litre) et une série d'autres substrats carbonés à la concentration de 1 g par litre. On voit qu'aucune de ces substances n'a d'influence nette sur le taux d'activité D-LDH et, par conséquent, ne réprime la biosynthèse de cet enzyme, dont on a déjà vu qu'il n'est pas réprimé non plus par le glucose. En ce qui concerne la L-LDH, les résultats de ces expériences montrent que seuls le mannitol et le galactose ont un effet semblable à celui du glucose et répriment, bien qu'à un degré sensiblement moindre, la biosynthèse de l enzyme. Le pyruvate, le fumarate, le maltose, le lactose et le citrate sont sans effet

Une série d'expériences de croissance a d'autre part été réalisée dans le but de déterminer si, en dehors du glucose, d'autres composés inhibent l'activité de la D-LDH. Dans les cultures en milieu mixte, contenant à la fois du pyruvate et du D-lactate (Fig. 15), la courbe de croissance revêt une forme

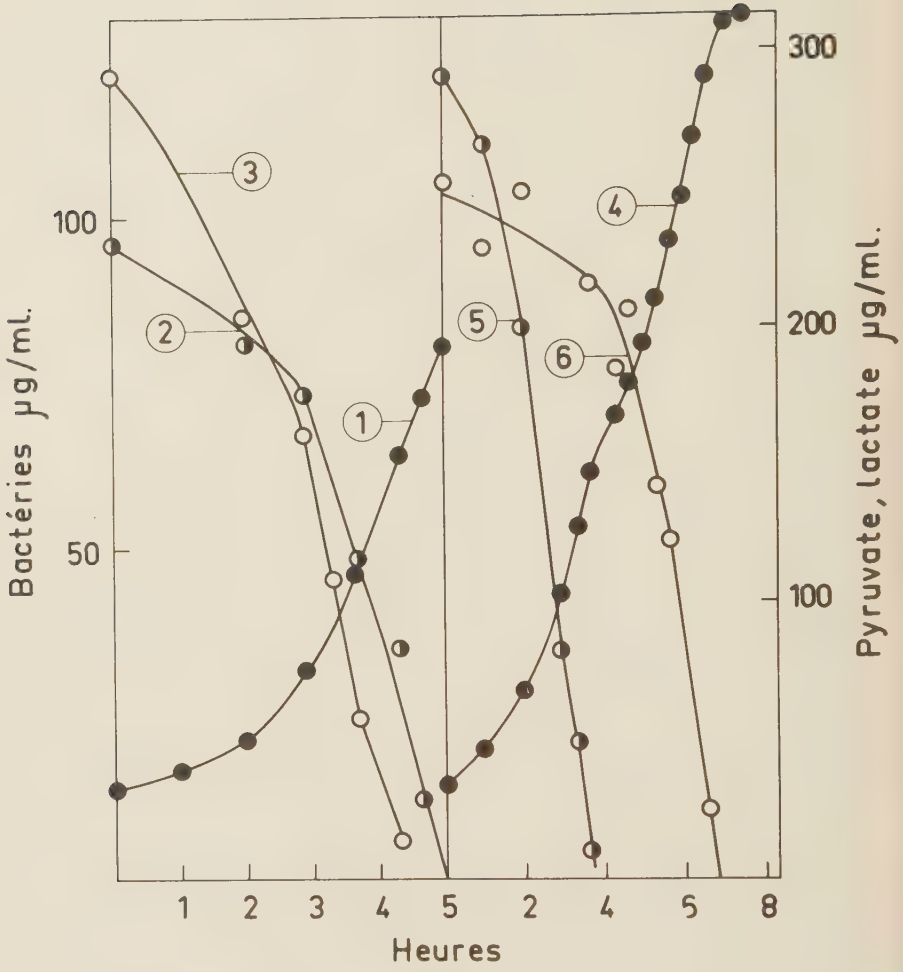


Fig. 15 - Croissance aérobie à 37° sur un mélange de pyruvate et de L-lactate (partie gauche) ou de pyruvate et de D-lactate (partie droite. Les concentrations en aliments carbonés sont exprimées en µg d'acide pyruvique ou d'acide lactique par ml. Courbes (1) et (4) : bactéries. Courbe (2) et (5) : pyruvate. Courbe (3) : L-lactate. Courbe (6) : D-lactate.

diauxique, comme en milieu D-lactate-glucose, et la consommation du D-lactate est retardée jusqu'à l'épuisement du pyruvate, bien que les cellules (Tableau XVIII) contiennent la D-LDH. Le pyruvate exerce donc sur l'activité de l'enzyme une inhibition tout à fait analogue à celle exercée par le glucose. Le fumarate, par contre, n'a aucun effet inhibiteur sur l'activité D-LDH, comme le montre l'expérience de la Fig. 16, où on ne constate pas de diauxie, et où les deux substrats (fumarate et D-lactate) disparaissent parallèlement dès le début de la croissance.

Des expériences similaires ont été réalisées en milieux contenant d'une part du D-lactate, et d'autre part, l'un des substrats suivants : mannitol, maltose, lactose et galactose (Fig. 17). On s'est borné, dans ces cas, à relever la courbe de croissance, et à déterminer si celle-ci était ou non de forme diauxique. Il a été ainsi constaté que l'activité D-LDH est inhibé par le mannitol, le galactose et le maltose, mais ne l'est pas par le lactose.

Dans toutes ces expériences de croissance, les résultats obtenus en ce qui concerne les milieux mixtes contenant du L-lactate, sont en accord avec ceux du Tableau XVIII. Ceux des substrats qui répriment la biosynthèse de la L-LDH (galactose et mannitol) provoquent des coirssance diauxiques, plus ou moins marqués suivant le degré de la répression exercée. Les milieux mixtes contenant les autres substrats (pyruvate, fumarate, lactose et maltose) assurent des croissances de type normal.

L'ensemble de ces résultats, résumé sur le Tableau XIX, montre que les deux effets d'inhibition de la D-LDH et de répression de la L-LDH sont indépendants. Certains substrats (galactose et mannitol) exercent, comme le glucose les deux effets, alors que d'autres (maltose et pyruvate) inhibent la D-LDH sans réprimer la L-LDH. Enfin, le fumarate et le lactose n'ont aucun des deux effets.

e) Influence de l'oxygène sur la biosynthèse de la L-LDH

Les extraits d'A. aerogenes provenant de cellules cultivées en anaérobiose sur glucose seul, possèdent une activité D-LDH semblable à celle des extraits obtenus à partir de cellules cultivées en aérobiose sur le même milieu ou sur lactate (Tableau XX).

La D-LDH formée en anaérobiose a les mêmes propriétés que celle produite en aérobiose. Les constantes de Michaëlis mesurées dans les deux cas sont, respectivement, $Km = 5,7. 10^{-4}$ M et $Km = 4,2. 10^{-4}$ M. D'autre part, l'enzyme "anaérobie" et l'enzyme "aérobie" réduisent le DCIP et la PMS dans le même rapport d'activité (DCIP/PMS = 3,2), et tous deux sont inhibés par l'oxalate 10^{-3} M de façon tout à fait comparable, les inhibitions étant de 87 % pour l'enzyme "anaérobie" et 70 % pour l'enzyme "aérobie". Ces observations permettent de considérer que les D-LDH formées en anaérobiose et en aérobiose sont identiques.

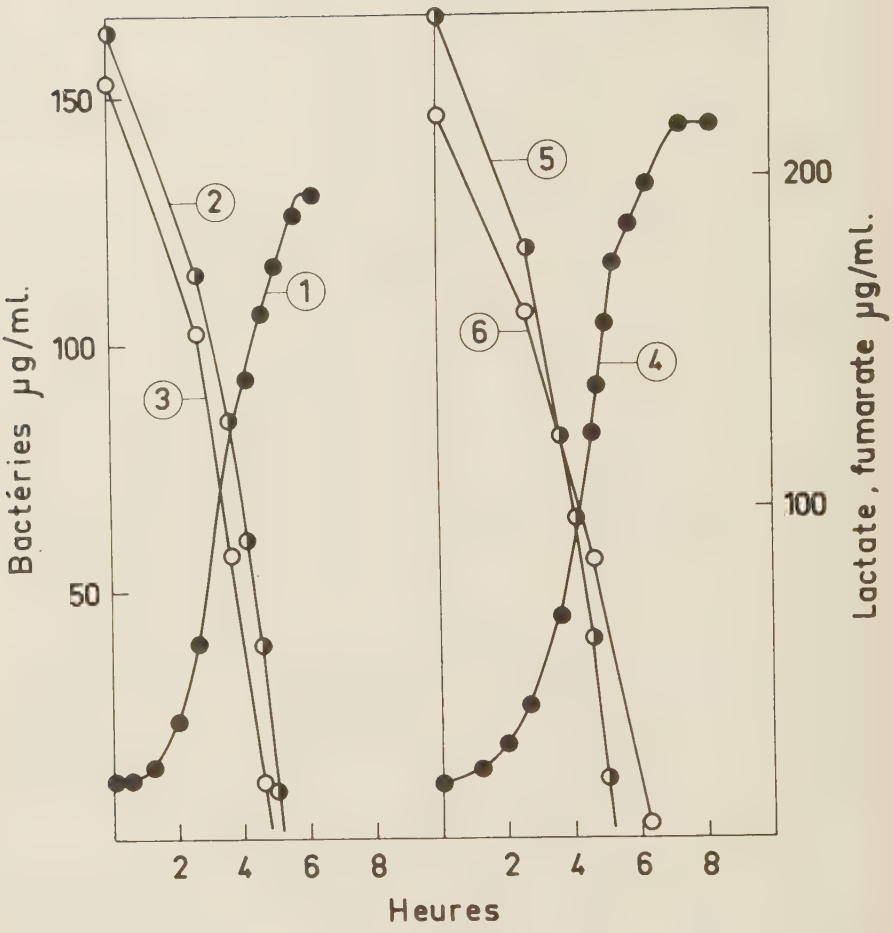


Fig. 16 - Croissance aérobie à 37° sur un mélange de fumarate et de L-lactate (partie gauche) et de fumarate et de D-lactate (partie droite). Les concentrations en aliments carbonés sont exprimées en µg d'acide fumarique ou d'acide lactique par ml. Courbes (1) et (4) : bactéries. Courbes (2) et (5) : fumarate. Courbe (3) : L-lactate. Courbe (6) : D-lactate.

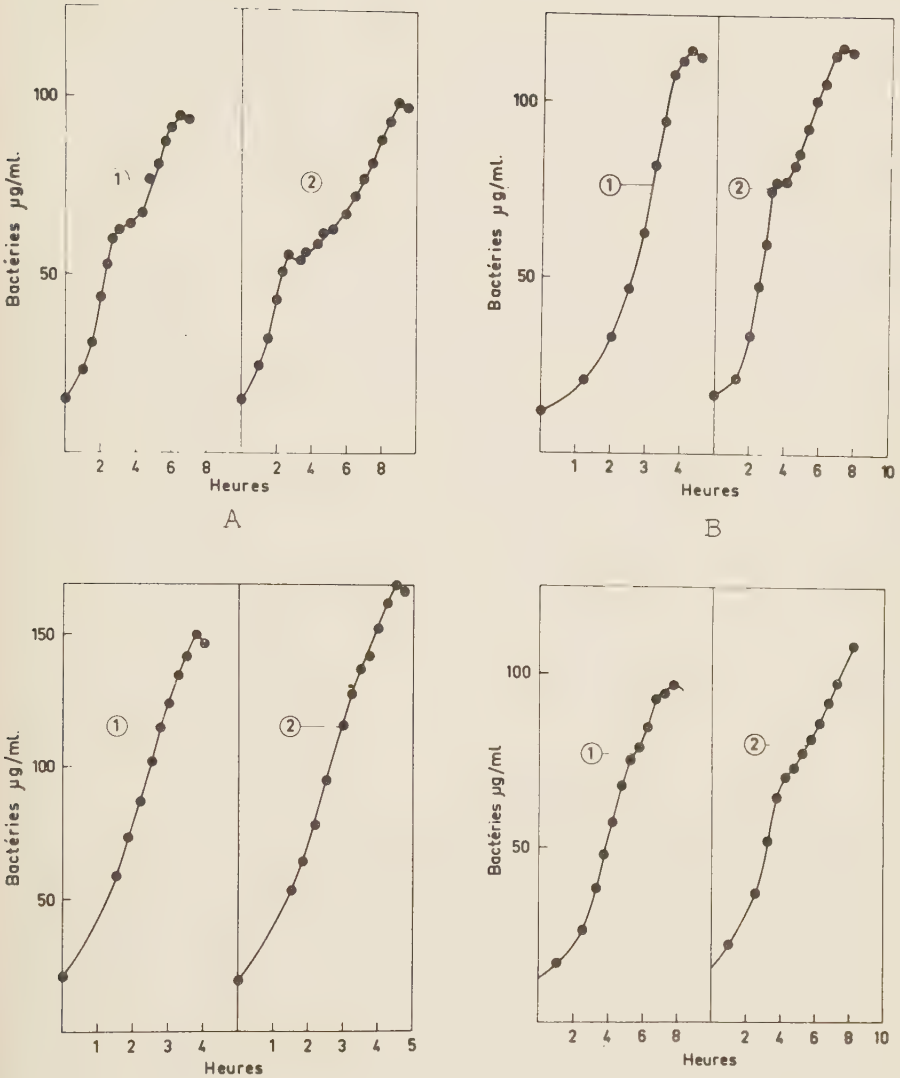


Fig. 17 - Croissance aérobie, à 37°, sur D- ou L-lactate en présence d'un autre aliment carboné. Les concentrations de sucres sont de 125 µg par ml ; celles de D- ou L-lactate, 225 µg par ml.

A: Courbe (1) : mannitol + L-lactate. Courbe (2) :mannitol+ D-lactate

B: Courbe (1) : maltose + L-lactate. Courbe (2) : maltose + D - lactate

C: Courbe (1) : lactose + L-lactate. Courbe (2) : lactose + D-lactate

D: Courbe (1) : galactose + L-lactate. Courbe (2) :galactose+D-lactate

TABLEAU XVIII

EFFETS DE DIVERS SUBSTRATS AUTRES QUE LE GLUCOSE SUR LES ACTIVITES D-LDH et L-LDH DES BACTERIES CULTIVEES EN AEROBIOSE EN PRESENCE DE D- OU L- LACTATE

Composition des milieux	Activités	
	D-LDH	L-LDH
D- lactate + pyruvate	22	8,5
+ fumarate	28	16,5
+ mannitol	56	8
+ lactose	44	13
+ galactose	26	7
+ citrate	41	31
L-lactate + pyruvate	24	17
+ fumarate	28	16
+ mannitol	29	4,8
+ lactose	42	29
+ galactose	34	8
+ maltose	30	31,5
+ citrate	30	41

Les extraits sont obtenus à partir de cellules cultivées à 37° en milieu contenant un mélange de lactate (0,25 g/l) et d'un autre substrat (1 g/l) et récoltées en phase exponentielle de la croissance

TABLEAU XIX

EFFETS COMPARATIFS DU GLUCOSE ET D'AUTRES SUBSTRATS CARBONES SUR L'ACTIVITE DE LA D-LDH ET SUR LA BIOSYNTHESE DE LA L-LDH

	Inhibition de la D-LDH	répression de la L-LDH
glucose	+	+
galactose	+	+
mannitol	+	+
maltose	+	0
pyruvate	+	0
fumarate	0	0
lactose	0	0

Les extraits des bactéries cultivées en anaérobiose ne possèdent, par contre, pas d'activité L-LDH, même si on ajoute dans le milieu du DL-, du D- ou du L-lactate, qui ne sont pas métabolisés en anaérobiose mais pourraient induire la formation de l'enzyme. Des résultats identiques sont obtenus lorsqu'on ajoute au glucose du fumarate ou du nitrate, qu'A. aerogenes utilise en anaérobiose comme accepteurs exogènes d'électrons (Forget et Pichinoty, 1964).

L'absence de L-LDH dans les bactéries anaérobies cultivées dans ces conditions, pouvant être due à une répression de la synthèse de cet enzyme par le glucose, on a mesuré l'activité L-LDH de cellules cultivées en anaérobiose sur d'autres substrats, dont il avait été précédemment établi qu'en aérobiose, ils ne répriment pas l'enzyme considéré. On a, en particulier, utilisé dans ce but des cultures anaérobies sur mélange de pyruvate et de fumarate et sur citrate avec ou sans addition de lactate.

A. aerogenes fermente le citrate grâce à la possession d'une citritase spécifique et distincte de l'enzyme de condensation, (Dagley et Dawes 1953 a, 1953 b). Cet enzyme, dont l'activité ne nécessite pas le coenzyme A, clive le citrate en acétate et en oxalacétate, qui est ultérieurement décarboxylé en pyruvate et CO_2.

TABLEAU XX

ACTIVITES D-LDH ET L-LDH D'EXTRAITS PROVENANT DE CELLULES CULTIVEES EN ANAEROBIOSE

Conditions de culture	Activités	
	D - LDH	L-LDH
Glucose seul	(35) (46	4 1
+ DL-lactate (2 g/l)	(39) (21	1 2
+ D-lactate (0,25 g/l)	42	1
+ L-lactate (0,25 g/l)	23	1
+ nitrate (5 g/l)	43	3
+ nitrate (5 g/l) + DL-lactate (2 g/l)	36	1
+ fumarate (5 g/l)	80	8
+ fumarate (5 g/l) + DL-lactate (2 g/l)	67	6

Tous les milieux de culture contiennent du glucose (2 g/l) avec ou sans addition d'autres substrats et accepteurs d'hydrogène.

TABLEAU XXI

ACTIVITES D-LDH et L-LDH D'EXTRAITS PROVENANT DE CELLULES CULTIVEES EN ANAEROBIOSE

Conditions de culture	Activités	
	D-LDH	L-LDH
Citrate seul	(102)	6
	(88)	2,7
+ DL-lactate (2 g/l)	(76)	6
	(94)	0,5
+ nitrate (5 g/l)	93	3,3
+ nitrate (5 g/l) + DL-lactate (2 g/l)	101	8
+ fumarate (5 g/l)	60	12
+ fumarate (5g/l) + DL-lactate (2 g/l)	38	4,8

Tous les milieux contiennent du citrate (5 g/l) avec ou sans addition d'autres substrats et accepteurs d'hydrogène.

Les extraits obtenus à partir de ces cultures sont dépourvus d'activité L-LDH, que les bactéries se soient développées en l'absence ou en présence de lactate (Tableau XXI et Tableau XXII), ce qui indique que la présence d'O_2 est indispensable à la biosynthèse de l'enzyme actif.

Il était intéressant de préciser l'effet du passage de l'aérobiose à l'anaérobiose sur le niveau intracellulaire des deux LDH. Dans ce but, des bactéries cultivées en aérobiose sur DL-lactate et contenant donc les deux enzymes, ont été récoltées par centrifugation, lavées et remises en suspension, sous vide, dans un milieu complet contenant, par litre, 5 g de citrate, 2 g de DL-lactate et 0,5g de Vitamin-free Casaminoacids (Difco). Les activités enzymatiques de la D-LDH et de la L-LDH, par unité de volume de la culture, ont été mesurés avant et après la croissance secondaire en anaérobiose, au cours de laquelle la densité bactérienne s'est accrue du facteur 2,26. Pour la commodité des comparaisons, les densités optiques et les activités de départ ont été ramenées à 100. Les résultats obtenus (Tableau XXIII) montrent qu'au cours de la croissance secondaire, les cellules ont

TABLEAU XXII

ACTIVITES D-LDH ET L-LDH D'EXTRAITS DE CELLULES CULTIVEES SUR UN MELANGE DE PYRUVATE (2 g/l) ET DE FUMARATE (2 g/l)

Conditions de culture	Activités	
	D-LDH	L-LDH
Aérobiose (°)		
Pyruvate + fumarate + D-lactate (0,25 g/l)	26	31
+ L-lactate (0,25 g/l)	48	33
Anaérobiose		
Pyruvate + fumarate seuls	38	4
+ DL-lactate (2 g/l)	(32)	3(1) ‰
	(59	9(1) ‰
+ D-lactate (0,25 g/l)	33	3(1) ‰
+ L-lactate (0,25 g/l)	43	5(1) ‰

(°) bactéries récoltées en phase exponentielle de croissance
‰ activité L-LDH mesurée en présence d'oxalate 10^{-3} M.

synthétisé la D-LDH, bien que la synthèse de cet enzyme n'ait pas exactement suivi l'accroissement de la densité bactérienne. Par contre, l'activité L-LDH est restée pratiquement stationnaire, ce qui correspond à une simple dilution de l'enzyme préalablement formé en aérobiose, et élimine la possibilité que l'anaérobiose provoque une inactivation de cet enzyme. En d'autres termes, l'absence d'oxygène empêche complètement la biosynthèse de la L-LDH en présence de ses inducteurs, mais n'a aucun effet sur l'activité de l'enzyme préformé.

3 - DISCUSSION

L'ensemble des faits qui ont été rapportés dans ce chapitre montre que les trois enzymes d'Aerobacter aerogenes participant au métabolisme du lactate, c'est-à-dire la pyruvate réductase à NAD, la D-LDH et la LDH, sont soumis à trois modes de régulation différents : (1) induction de la biosynthèse de l'enzyme,

TABLEAU XXIII

EFFET DU PASSAGE DE L'AEROBIOSE A L'ANAEROBIOSE SUR LE NIVEAU CELLULAIRE DES ACTIVITES D-LDH ET L-LDH

	Densité optique	Activités pal ml de culture	
		D-LDH	L-LDH
Culture initiale	100	100	100
Culture secondaire incubée en anaérobiose	226	186	94

Conditions expérimentales décrites dans le texte.

(2) action de certains métabolites et en particulier du glucose, sur la biosynthèse ou sur l'activité de l'enzyme, et enfin (3) effet de l'oxygène sur l'induction enzymatique.

La pyruvate-réductase est toujours formée, en aérobiose ou en anaérobiose, quel que soit le substrat utilisé pour la croissance. Elle est donc "constitutive" au sens strict du terme, ou induite par un métabolite intermédiaire, tel que par exemple, le pyruvate, formé dans toutes les conditions de croissance où l'on s'est placé. Elle n'est, d'autre part, ni réprimée ni inhibée par le glucose ou par O_2.

Le fait que la pyruvate-réductase soit toujours formée conduit à penser qu'en dehors de son rôle dans la réoxydation du $NADH_2$, processus exclusivement anaérobie, cet enzyme assure une autre fonction indispensable à la cellule.

Il est possible, en particulier, que l'acide D-lactique soit indispensable à la paroi cellulaire. En effet, chez toutes les bactéries jusqu'ici étudiées, et notamment, en ce qui concerne les Entérobactéries, chez Escherichia coli (Weidel et Primosingh, 1957), on a mis en évidence la présence d'acide muramique (3-O-lactyl-glucosamine). La configuration du résidu lactyle n'a été étudié que chez Bacillus megatherium et, dans ce cas, paraît être la forme D (Strange et Kent, 1959 ; Matsushima et Park, 1961). S'il en était de même chez A. aerogenes, on s'expliquerait la présence constante dans les cellules d'une pyruvate-réductase conduisant à la formation de D-lactate

La D-LDH, comme l'enzyme précédent, est toujours formée, en aérobiose et en anaérobiose, en l'absence ou en présence de lactate. Du fait que la D-LDH partage ce comportement avec la pyruvate-réductase, il est évidemment

possible que sa biosynthèse soit induite par le D-lactate endocellulaire formé à partir du pyruvate par l'autre enzyme. Pour éliminer cette possibilité, il faudrait disposer d'un mutant ayant spécifiquement perdu le pouvoir de synthétiser la pyruvate-réductase. Mais, cette dernière n'ayant pas de fonction métabolique ou physiologique connue, il n'existe pas, pour le moment, de moyen de sélection permettant d'isoler un tel mutant.

Le glucose, le galactose, le mannitol, le maltose et le pyruvate inhibent l'activité D-LDH des cellules entières, mais ne répriment pas la biosynthèse de l'enzyme. Le fait que, in vitro, le glucose et les intermédiaires de la glycolyse soient sans effet sur l'activité D-LDH suggère que l'inhibition des bactéries entières par ce métabolite porte sur l'activité d'un système "perméase" plutôt que sur celle de la déshydrogénase elle-même. Cependant, il est encore possible que l'enzyme soit inhibé par un produit métabolique intermédiaire ne figurant pas parmi ceux qui ont été essayés.

L'anaérobiose ne supprime pas la biosynthèse de la D-LDH. Au contraire, les bactéries cultivées en anaérobiose sur citrate ou sur fumarate ont une activité D-LDH 2 à 3 fois supérieure à celle des cellules cultivées anaérobiquement sur glucose ou aérobiquement sur tous les autres substrats, y compris le lactate. Nous ne savons pas si ce comportement est dû à ce que l'enzyme est produit sous une forme plus active ou en plus grande quantité.

La régulation la plus complexe est celle de la L-LDH. Cet enzyme est inductible et sa biosynthèse est induite non stéréospécifiquement par le D- et par le L-lactate. Aucun autre des métabolites étudiés et, en particulier, le pyruvate, qui est le produit de la réaction catalysée par l'enzyme, n'est inducteur. Le caractère non stéréospécifique de l'induction par le lactate est confirmé par l'absence, déjà signalée, d'activité lactate-racémase chez A. aerogenes.

La biosynthèse de la L-LDH est réprimée par le glucose, le galactose et le mannitol. Elle ne l'est pas par le maltose et par le pyruvate, bien que ceux-ci inhibent l'activité de la D-LDH. D'autre part, l'oxygène ou tout au moins la croissance en aérobiose, est indispensable à la synthèse de la L-LDH, en présence de lactate. Les bactéries cultivées anaérobiquement en présence d'accepteurs d'électrons exogènes (fumarate, nitrate) étant également dépourvues de L-LDH, on peut considérer que la présence d'O_2 lui-même est nécessaire à l'induction enzymatique.

Il n'est pas possible de savoir si l'oxygène agit comme un véritable inducteur ; son action pourrait, en effet, être de nature indirecte, O_2 éliminant par oxydation un ou des répresseurs endogènes constitués par des intermédiaires métaboliques qui s'accumuleraient en anaérobiose.

De même l'accumulation dans les cellules non proliférantes de répresseurs normalement utilisés pour la biosynthèse cellulaire, pourrait expliquer que la L-LDH n'est produite que par les bactéries en croissance (Mandelstam, 1961).

TABLEAU XXIV

COMPARAISON SYNOPTIQUE ENTRE LA REGULATION DES ENZYMES DE LA LEVURE ET CEUX D'AEROBACTER AEROGENES

	INDUCTION	GLUCOSE	OXYGENE
1°) Aerobacter aerogenes			
pyruvate-réductase	constitutive	sans effet	sans effet
D-LDH	constitutive	inhibe l'activité intracellulaire	sans effet
L-LDH	induite par le L- et le D-lactate	réprime la synthèse	nécessaire à la synthèse
2°) Saccharomyces cerevisiae			
D-LCR	induite par le L- et le D-lactate (1)	réprime la synthèse (1)	nécessaire à la synthèse(3)
L-LCR	id° (1)	id° (1)	id° (4)
D-LDH	constitutive (2)	sans effet direct (2)	sans effet (2)

(1) Somlo (1965) ; (2) Somlo (communication personnelle) ;
(3) Nygaard (1961 b) ; (4) Slonimski (1956).

Cette dernière hypothèse a été également envisagée par Somlo (1965) pour rendre compte du fait que, chez la levure comme chez A. aerogenes, la D- et la L-LCR, ne sont formées qu'en croissance.

Les modes de régulation des trois enzymes d'A. aerogenes sont résumés synoptiquement sur le Tableau XXIV où on a également porté, à titre comparatif, les propriétés des trois lactate-déshydrogénases de la levure. Ce tableau souligne de façon explicite les différences existant entre les enzymes d'A. aerogenes et ceux de la levure, en ce qui concerne leur régulation. Il existe, en particulier, une similitude étroite à cet égard entre la L-LDH d'A. aerogenes et la L-LCR de la levure, bien qu'il s'agisse d'enzyme très différents le second seulement étant couplé fonctionnellement au cytochrome c.

En ce qui concerne la régulation des LDH des autres espèces bactériennes, les données sont encore trop fragmentaires pour permettre une comparaison aussi poussée. Klyne et Mahler (1965) ont montré que, chez Escherichia coli, il existe, comme chez A. aerogenes, une D-LDH "constitutive" et une L-LDH induite non stéréospécifiquement par le lactate ; mais ces auteurs n'ont étudié ni l'influence de l'oxygène, ni l'action du glucose sur la biosynthèse des deux enzymes. Le seul organisme bactérien où une répression de la biosynthèse de LDH ait été mise en évidence est Butyribacterium rettgeri (Wittenberger et Haaf, 1964) ; toutefois, la stéréospécificité du ou des enzymes mis en jeu n'a pas été précisée, du fait que les auteurs n'ont pas utilisé des isomères purs.

Chapitre V

LACTATE-DESHYDROGENASES ET PYRUVATE-REDUCTASE D'AUTRES BACTERIES

1- ENTEROBACTERIES

Le comportement à l'égard du lactate et du pyruvate de diverses autres Entérobactéries a été systématiquement comparé à celui d'Aerobacter aerogenes De cette étude comparative, on a exclu un petit nombre d'espèces (Proteus morganii , P. rettgeri et diverses souches appartenant au groupe Providencia) qui se sont révélées incapables de se développer en aérobiose en utilisant le DL- lactate comme seule source d'énergie et de carbone.

Toutes les autres espèces étudiées possèdent à la fois une pyruvate- réductase et deux lactate-déshydrogénases stéréospécifiques ; elles sont, d'autre part, dénuées de toutes activité racémase à l'égard du lactate.

En ce qui concerne l'activité pyruvate-réductase (Tableau XXV), celle-ci est sensiblement du même ordre que chez A aerogenes, à la seule exception, cependant, de Citrobacter freundii (Escherichia freundii) chez qui le niveau de l'enzyme, estimé d'après l'activité spécifique des extraits, paraît être significativement plus élevée que chez les autres organismes.

Dans tous les cas, le produit de la réduction du pyruvate a été identifié comme étant le D-lactate qui s'accumule, d'ailleurs, dans les cultures anaérobies sur glucose de tous les organismes considérés. En ce qui concerne le genre Serratia, nos résultats confirment ceux de Pederson et Breed (1928).

L'activité est spécifique pour le $NADH_2$, à l'exclusion du $NADPH_2$ et l'enzyme présente la même irréversibilité apparente que chez A aerogenes, comme le montre le fait qu'à pH 10, on n'a jamais constaté de réduction du NAD ou du NADP en présence de D-lactate.

Il existe également une similitude étroite entre ces diverses Entérobactéries et A. aerogenes en ce qui concerne l'activité D-LDH et la régulation de cet enzyme. Comme le montre les Tableaux XXVI et XXVI bis toutes les espèces d'Enterobacteriaceae essayées forment une D-LDH de caractère "constitutif" dont, en règle générale, la biosynthèse n'est pas inhibée par l'anaérobiose Les activités spécifiques relevées sont sensiblement du même ordre de grandeur que chez A. aerogenes, et les différences constatées ne peuvent être considérées comme significatives.

TABLEAU XXV

ACTIVITES PYRUVATE-REDUCTASE D'EXTRAITS OBTENUS A PARTIR DE DIVERSES ENTEROBACTERIES

Espèces	Activités
Aerobacter aerogenes	135
Escherichia coli	104
Citrobacter freundii	294
Aerobacter cloacae	125
Klebsiella	101
Serratia	160
Salmonella typhimurium	141
Hafnia	147
Proteus vulgaris	105
P. mirabilis	61

Les activités sont exprimées en µmoles de puryvate réduites par heure et par mg d'azote protéique.

Parmi les Entérobactéries étudiées, les seules variations importantes concernent la L-LDH. Si, dans tous les cas, cet enzyme n'est formé, comme chez A. aerogenes, qu'en aérobiose, il n'est induit par le lactate que chez certaines espèces (Proteus mirabilis, Serratia, Escherichia coli, Citrobacter freundii, Klebsiella, Aerobacter cloacae). Par contre, Proteus vulgaris, Hafnia et Salmonella typhimurium "inter" possèdent une activité L-LDH, que les cellules soient cultivées ou non en présence de lactate.

2 - MICROCOCCUS DENITRIFICANS

Il résulte des observations qui viennent d'être rapportées, que le comportement des Entérobactéries à l'égard du lactate présente une grande homogénéité. La plupart de ces organismes possèdent à la fois une pyruvate-réductase à $NADH_2$ et deux lactate-déshydrogénases, dont les régulations sont semblables.

Il était intéressant d'établir si ces propriétés sont générales chez les bactéries ou s'il existe d'autres types de lactate-déshydrogénases bactériennes.

TABLEAU XXVI

ACTIVITES D-LDH ET L-LDH D'EXTRAITS OBTENUS A PARTIR DE DIVERSES ENTEROBACTERIES

Espèces	Conditions de culture	Activités	
		D-LDH	L-LDH
Aerobacter aerogenes	DL-lactate + O_2	23	15
	Glucose + O_2	26	1,5
	Glucose - O_2	35	4
	Glucose + DL-lactate - O_2	17	3
Aerobacter cloacae	DL-lactate + O_2	30	30
	Glucose + O_2	40	2
	Glucose - O_2	58	10
	Glucose + DL-lactate - O_2	36	2
Escherichia coli	DL-lactate + O_2	24	29
	Glucose + O_2	17	6
	Glucose - O_2	30	4
	Glucose + DL-lactate - O_2	23	1,3
Citrobacter freundii	DL-lactate + O_2	35	17
	Glucose + O_2	17	2
	Glucose - O_2	12	2
	Glucose + DL-lactate - O_2	16	2,5
Serratia	DL-lactate + O_2	7	28
	Glucose + O_2	11	1
	Glucose - O_2	17	1
	Glucose + DL-lactate - O_2	14	5,6

abréviations : + O_2, aérobiose ; - O_2, anaérobiose.

TABLEAU XXVI bis

ACTIVITES D-LDH ET L-LDH D'EXTRAITS OBTENUS A PARTIR DE DIVERSES ENTEROBACTERIES

Espèces	Conditions de culture	Activités	
		D-LDH	L-LDH
Klebsiella	DL-lactate + O_2	48	39
	Glucose + O_2	34	7
	Glucose - O_2	29	6
	Glucose + DL-lactate - O_2	50	8
Hafnia	DL-lactate + O_2	37	90
	Glucose + O_2	50	20
	Glucose - O_2	35	8
	Glucose + DL-lactate - O_2	104	17
Salmonella typhimurium	DL-lactate + O_2	34	38
	Glucose + O_2	26	12
	Glucose - O_2	65	1
	Glucose + DL-lactate - O_2	14	2,3
Proteus vulgaris	DL-lactate + O_2	15	19
	Glucose + O_2	21	14
	Glucose - O_2	11	1
	Glucose + DL-lactate - O_2	8	0,7
Proteus mirabilis	DL-lactate + O_2	22	12
	Glucose + O_2	19	6
	Glucose - O_2	13,5	1,5
	Glucose + DL-lactate - O_2	10	1

Abréviations : + O_2, aérobiose ; - O_2, anaérobiose.

Dans ce but, on a utilisé Micrococcus denitrificans qui, à la différence des Entérobactéries est dépourvu de véritable métabolisme fermentaire et ne se développe en anaérobiose qu'en présence d'un accepteur d'hydrogène : nitrate nitrite ou oxyde nitreux. Cet organisme est capable de se développer à partir du D- ou L-lactate, en aérobiose comme en anaérobiose.

Les activités respiratoires des cellules de M. denitrificans cultivées dans différentes conditions et sur divers substrats, sont rapportées sur le Tableau XXVII. On voit que les bactéries possèdent, dans tous les cas, une activité respiratoire du même ordre de grandeur en présence de D- ou L-lactate, et que ces activités sont sensiblement plus élevées lorsque les organismes ont été cultivés en anaérobiose.

Les extraits, préparés à partir de ces cultures, réduisent activement le DCIP, en présence de l'un ou l'autre des deux énantiomorphes du lactate (Tableau XXVIII) On s'est assuré, d'autre part, en employant les techniques précédemment décrites que ni les cellules entières, ni les extraits ne racémisent le lactate. Il ne fait donc pas de doute que les activités D-LDH et L-LDH, dont le rapport varie d'une manière significative d'une expérience à l'autre (Tableau XXVIII), sont dues à deux enzymes stéréospécifiques.

Contrairement à celles d'A aerogenes, la D-LDH et la L-LDH de M denitrificans sont toutes deux capables de réduire le ferricytochrome c de coeur de boeuf (Sigma) Cependant, en présence de cet accepteur, les activités sont beaucoup plus faibles qu'avec le DCIP (Tableau XXIX). Les enzymes n'ayant pas été purifiés, il n'est pas possible de préciser si le couplage avec le cytochrome c est direct ou met en jeu d'autres transporteurs. Il est probable, cependant, que les deux déshydrogénases fonctionnent comme lactate-cytochrome-réductases, comme c'est le cas chez la levure. Il convient de souligner que M denitrificans possède un cytochrome c ayant la propriété d'être réoxydé par la cytochrome-oxydase des mammifères (Kamen et Vernon, 1955).

Outre le DCIP et le cytochrome c, les deux enzymes réduisent le PMS. Dans les conditions de nos expériences, le rapport des activités DCIP/PMS est de 6 pour la D-LDH et 1,2 pour la L-LDH.

Les constantes de Michaëlis, mesurées en présence de DCIP à la concentration de $4,5.10^{-5}$ M, sont de $1,35.10^{-3}$ M pour la D-LDH et $4,5\ 10^{-3}$ M pour la L-LDH, c'est-à-dire, respectivement, trois fois et cent fois plus élevées que celles des enzymes d'A. aerogenes.

Les activités des deux LDH sont inhibées à 90 % par l'oxalate 10^{-3} M, alors que cette substance à la même concentration, est sans effet sur la L-LDH d'A. aerogenes.

Une autre différence importante de ces enzymes avec celles d'A aerogenes réside dans leur absence apparente de régulation. La D-LDH et la L-LDH sont synthétisées aussi bien en anaérobiose qu'en aérobiose, quel que soit l'aliment

TABLEAU XXVII

ACTIVITES RESPIRATOIRES DE SUSPENSIONS CELLULAIRES DE M-DENITRIFICANS A L'EGARD DU D- ET DU L-LACTATE

Conditions de culture	Activités	
	D-lactate	L-lactate
Aérobiose		
DL-lactate	10	8
Glucose	26	25
Succinate	24	32
Anaérobiose en présence de NO_3^-		
DL-lactate	58	68
D-lactate	54	51
L-lactate	75	50
Glucose	31	63
Succinate	40	55

Les mesures sont effectuées par la méthode manométrique de Warburg. Conditions expérimentales : D- ou L-lactate, 32 µmoles ; bactéries, environ 5 mg ; chloramphénicol, 15 µg ; tampon phosphates (pH 7,0) 165 µmoles ; KOH 40 %, 0,1 ml (puits central) ; volume total, 3 ml ; température 37 °. Les activités ($^{Q}O_2$) sont exprimées en µl O_2 consommés en une heure par mg de cellules (poids sec), respiration endogène déduite.

TABLEAU XXVIII

ACTIVITES D-LDH ET L-LDH DES EXTRAITS DE M. DENITRIFICANS CULTIVE DANS DIFFERENTES CONDITIONS

Conditions de culture	Activités	
	D-LDH	L-LDH
Aérobiose		
DL-lactate (2 g/l)	(67 (1)) 28 (125	23 (1) 59 28
D-lactate (0,5 g/l)	64	12
L-lactate (0,5 g/l)	59	25
Glucose (1 g/l)	(11) 23	28 5
Glucose (1 g/l) + DL-lactate (0,7 g/l)	(87 (1)) 49 (37	13 (1) 39 11
Succinate (1 g/l)	(8 (1)) 12	10 (1) 14
Pyruvate (1 g/l)	16	11
Anaérobiose en présence de NO_3^-		
DL-lactate (2 g/l)	(40) 48	21 18
D- lactate (0,5 g/l)	39	13
L-lactate (0,5 g/l)	105	25
Glucose (2 g/l)	27	23
Glucose (1 g/l) + DL-lactate (0,7 g/l)	(16) 53	15 8
Succinate (2 g/l)	7	8

(1) Activité d'extrait provenant de cellules récoltées en phase exponentielle de croissance.

TABLEAU XXIX

ACTIVITES COMPAREES DE LA D-LDH ET DE LA L-LDH DE DIFFERENTS EXTRAITS DE M. DENITRIFICANS EN PRESENCE DE DCIP ET DE CYTOCHROME C DES MAMMIFERES

Conditions de cultures des bactéries	Accepteur	Activités	
		D-LDH	L-LDH
Aérobiose			
DL-lactate	DCIP	41	18
	cytochrome c	6,2	3,1
Glucose	DCIP	23	15
	cytochrome c	3,5	2,8
Anaérobiose en présence de NO_3^-			
DL-lactate	DCIP	48	18
	cytochrome c	1,4	3
Glucose	DCIP	18	19
	Cytochrome c	1,1	1,5

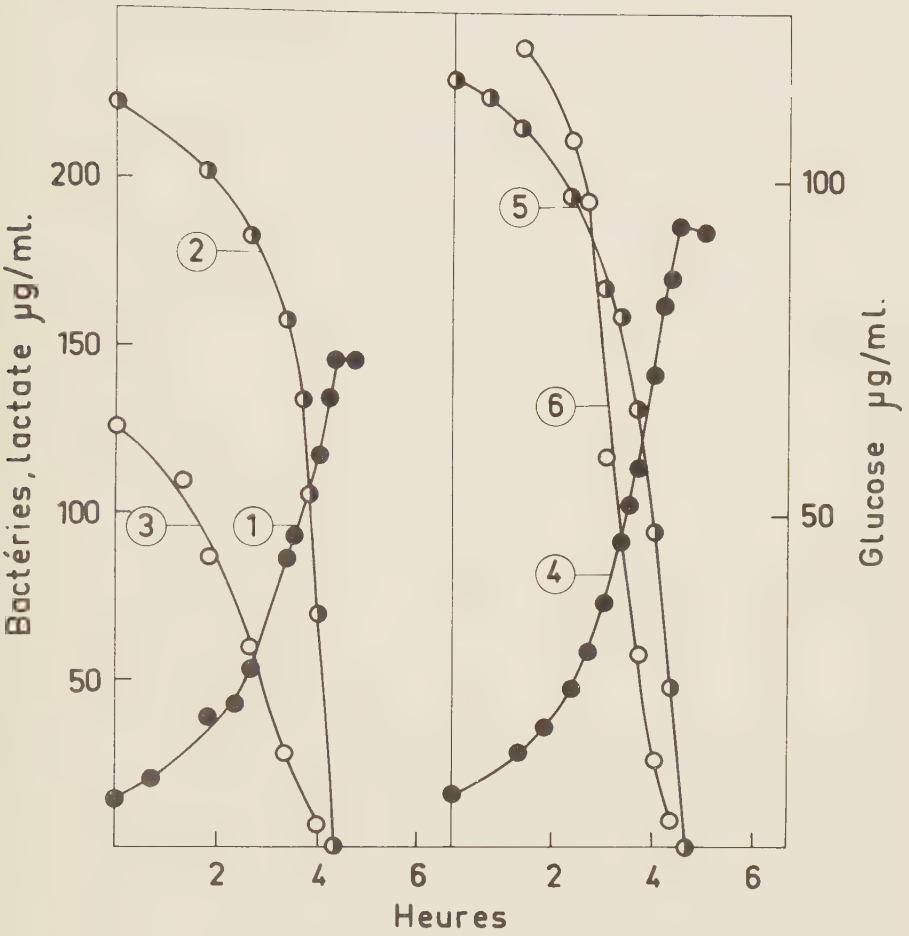


Fig. 18 - Croissance aérobie, à 37° de M. denitrificans sur un mélange de glucose et de L-lactate (partie gauche) ou de glucose et de D-lactate (partie droite). Les concentrations des aliments carbonés sont exprimées en g d'acide lactique ou de glucose par ml. Courbes (1) et (4) : bactéries. Courbes (2) et (5) : glucose. Courbe (3) : L-lactate. Courbe (6) : D-lactate.

carboné utilisé par la bactérie (Tableau XXVIII) ; elle se comportent donc comme des enzymes "constitutifs".

En outre, les expériences de croissance en aérobie, dans des milieux contenant à la fois du glucose et du D- ou L-lactate (Fig. 18), montrent que, dans ces conditions, l'organisme utilise simultanément les deux substrats et que les croissances ne sont pas de forme diauxique. En conséquence, la biosynthèse de la D-LDH et de la L-LDH de M denitrificans n'est pas réprimée par le glucose, ce qui concorde d'ailleurs avec le fait que les deux activités sont présentes dans les extraits de cellules cultivées sur glucose et DL-lactate (Tableau XXIX)

De même, il semble pas que le glucose exerce sur l'activité des LDH une inhibition semblable à celle qui a été observée dans le cas de la D-LDH d'A. aerogenes.

CONCLUSIONS

Le présent travail a été entrepris dans le cadre des recherches, poursuivies dans notre laboratoire, depuis plusieurs années, sur les enzymes bactériensd' oxydoréduction et sur la régulation de leur biosynthèse. Les enzymes participant au métabolisme de l'acide lactique offraient, à ce sujet, un matériel d'étude particulièrement intéressant. En effet, le lactate est non seulement un substrat oxydatif utilisé en aérobiose par de nombreuses bactéries, mais encore un produit du métabolisme fermentaire chez ceux de ces organismes qui sont anaérobies facultatifs. En outre, au moment où nous avons commencé notre étude, on savait déjà que chez la levure plusieurs enzymes interviennent dans le métabolisme du lactate, enzymes structurellement et fonctionnellement distincts par leur stéréospécificité, la nature de leur coenzyme, leurs rapports avec la chaîne respiratoire et la régulation de leur biosynthèse.

En ce qui concerne les lactate-déshydrogénases (LDH) des bactéries, on ne possédait alors que peu d'informations. Il était établi que, suivant l'espèce considérée, les bactéries de la fermentation homo- et hétérolactique forment l'un ou l'autre des deux isomères, ou un mélange racémique des deux, grâce à la possession d'un ou de plusieurs enzymes stéréospécifiques. D'autre part, divers faits expérimentaux avaient conduit à penser que les enzymes bactériens assurant en aérobiose l'oxydation du lactate étaient distinct de ceux de la fermentation lactique chez un même organisme. Cependant, on n'avait pratiquement aucune information sur la régulation de ces différents enzymes, c'est-à-dire sur les conditions de leur biosynthèse et de leur activité.

La bactérie que nous avons tout d'abord étudiée, Aerobacter aerogenes, avait déjà été utilisé dans notre laboratoire pour la mise en évidence de la répression par l'oxygène de plusieurs enzymes d'oxydoréduction spécifiques de la vie anaérobie. Cet organisme fournissait un bon matériel pour l'étude que nous désirions entreprendre du fait qu'anaérobie facultatif, il forme à partir du glucose de l'acide lactique et, en aérobiose utilise celui-ci comme substrat de croissance.

Chez A. aerogenes, nous avons mis en évidence et caractérisé trois enzymes distincts intervenant dans le métabolisme de l'acide lactique : deux LDH stéréospécifiques, à fonction purement oxydative, et un enzyme, auquel du fait

de son irréversibilité dans les conditions physiologiques, nous avons attribué la dénomination de pyruvate-réductase.

Les deux premiers enzymes sont de nature particulaire, et, à la firrérence de ceux de la levure, ne sont pas couplés au cytochrome c des mammifères. Ces enzymes sont indépendants des pyridine-nucléotides et de nature flavoprotéique. Dans le cas de l'un d'entre eux (L-LDH), le coenzyme a pu être identifié comme étant le FMN. Ils se distinguent entre eux par le fait que l'oxalate inhibe la D-LDH à des concentrations qui sont sans effet sur l'activité de la L-LDH. On a, d'autre part, établi l'absence, chez l'organisme considéré, de lactate-racémase .

La pyruvate-réductase fonctionne spécifiquement avec le $NADH_2$ et le pyruvate et forme du D-lactate. Nous avions constaté que cet enzyme est incapable de déshydrogéner le D-lactate en présence de NAD comme accepteur d'hydrogène. Il a pu être établi qu'en fait cette irréversibilité est seulement apparente et liée à une inactivation de l'enzyme aux pH alcalins qu'on utilise classiquement pour mettre en évidence la conversion du lactate en pyruvate par les LDH à pyridine-nucléotides. En remplaçant le NAD par son dérivé acétylé, dont le potentiel standard d'oxydoréduction est plus proche de celui du couple lactate-pyruvate, une activité lactate-déshydrogénase a pu être démontrée.

Ces observations sont intéressantes dans la mesure où elles confirment l'interprétation déjà proposée par plusieurs auteurs suivant laquelle les "lactate-déshydrogénases" à pyridine-nucléotides sont en réalité des pyruvate-réductases, et, dans les conditions physiologiques de pH, ne jouent aucun rôle fonctionnel dans la déshydrogénation du lactate, mais seulement dans sa formation.

Du fait de leur nature particulaire, les deux LDH flavoprotéiques n'ont pu être purifiées. De même la pyruvate-réductase, bien que soluble, s'est montrée trop labile et est présente dans les cellules en trop faibles quantités pour que sa purification ait pu être poussée au-delà de 30 fois par rapport aux extraits bruts. Cette purification partielle a été obtenue par précipitation fractionnée avec le sulfate d'ammonium et filtration sur tamis moléculaire (Sephadex G- 100).

En dehors de son irréversibilité apparente, la pyruvate-réductase présente quelques caractères intéressants, en particulier, son activation non spécifique par la force ionique du milieu.

L'essentiel de notre travail a porté sur la régulation des trois enzymes dont la nature chimique et les propriétés viennent d'être brièvement résumées. Cette étude a mis en évidence des systèmes régulateurs d'une grande complexité. Les enzymes participant chez A. aerogenes au métabolisme du lactate, sont soumis à des processus de régulation différents : inductibilité et répression de la biosynthèse protéique, et inhibition de l'activité par certains métabolites. Le nombre et la nature de ces divers mécanismes régulateurs diffèrent suivant l'enzyme considéré :

1°) Aucun d'entre eux n'agit sur la pyruvate-réductase qui est formée

par la bactérie dans toutes les conditions de culture. Il est évidemment possible que la biosynthèse de l'enzyme soit induite par un intermédiaire constant du métabolisme, mais aucune donnée expérimentale ne permet de retenir ou d'écarter cette possibilité.

A la différence de plusieurs autres enzymes, comme la butanediol-déshydrogénase ou la nitrate-réductase, qui chez le même organisme, n'apparaissent qu'en anaérobiose, la pyruvate-réductase n'est pas réprimée par l'oxygène. Il s'agit donc d'une interessante exception à la règle suivant laquelle l'oxygène réprime, chez les bactéries anaérobies facultatives, la biosynthèse des système d'oxydoréduction à fonction purement fermentative.

2°) La D-LDH est toujours formée, en aérobiose comme en anaérobiose, et en présence comme en l'absence de lactate. Sa nature "constitutive" au sens strict du terme ne peut cependant pas être affirmée, la biosynthèse de l'enzyme pouvant, en effet, être induite dans toutes les conditions de culture, par le D-lactate que forme la pyruvate-réductase, elle-même, comme on vient de le voir, toujours présente dans la cellule. Pour tenir compte de cette possibilité, il faudrait pouvoir obtenir des mutants dépourvus de pyruvate-réductase, mais dans l'état actuel des choses, aucun moyen ne permet de sélectionner de tels mutants.

Comme, en anaérobiose, A. aerogenes est incapable d'utiliser le D-lactate, la synthèse de la D-LDH dans ces conditions est purement "gratuite".

La D-LDH est inhibée, mais non réprimée, par le glucose. Ce comportement est mis en évidence par le fait que, dans les cultures aérobies sur un mélange de glucose et de D-lactate, ce dernier substrat n'est utilisé qu'après l'épuisement complet du premier. Cependant, les extraits des cellules récoltées pendant la phase de croissance aux dépens du glucose, possèdent une activité D-LDH aussi élevée que les extraits des cellules récoltées après épuisement du glucose, ou directement cultivées sur lactate. Le glucose et les intermédiaires de la chaîne glycolytique n'inhibant pas in vitro l'activité D-LDH des extraits, l'effet du glucose au cours de la croissance ne peut s'expliquer par une inhibition de l'enzyme lui-même, mais vraisemblablement par l'inhibition d'un système de perméation. Sans doute la confirmation de cette hypothèse pourra-t-elle être obtenue grâce à l'isolement de mutants ayant spécifiquement perdu le pouvoir de former la D-LDH. De tels mutants devraient être capables d'accumuler le D-lactate, et cette activité devrait être inhibée par le glucose. Nous nous proposons de poursuivre notre étude dans ce sens. Quoiqu'il en soit, le fait que le glucose empêche l'utilisation du D-lactate par les cultures aérobies réalisées en présence de ces deux substrats, a pour effet de conférer aux courbes de croissance correspondantes une allure "diauxique". Cette constatation présente un grand intérêt du fait qu'elle démontre que, dans certains cas, une courbe de croissance diauxique est due à l'inhibition d'un système enzymatique et non pas à une répression catabolique.

3°) La L-LDH, contrairement à l'enzyme précédent, est induite par le

lactate. Il est intéressant que cette induction ne soit pas stéréospécifique et que le D-lactate induise la biosynthèse de l'enzyme aussi bien que le L-lactate, dans des conditions expérimentales excluant toute possibilité d'induction due à une contamination du D-lactate par son antipode optique. Ici encore, l'induction de la L-LDH par le D-lactate conduit à la biosynthèse "gratuite" d'un enzyme ne pouvant métaboliser cet inducteur et donc dépourvu de toute fonction physiologique.

La biosynthèse de la L-LDH nécessite non seulement la présence de lactate, mais encore celle d'O_2 libre. Le rôle de l'oxygène dans l'induction peut s'expliquer a priori de deux façons. Il est possible que l'oxygène, ou plus exactement l'activité respiratoire, agisse en oxydant le ou les répresseurs de la L-LDH, qui seraient des produits non déterminés du métabolisme intermédiaire et qui s'accumuleraient pendant la vie en anaérobiose. Une autre possibilité est que l'oxygène ait un rôle de co-inducteur et contribue directement à la biosynthèse de la L-LDH.

Enfin, nous avons pu établir que la biosynthèse de la L-LDH est soumise à la répression catabolique, c'est-à-dire à l'effet glucose. Le glucose supprime presque complètement la formation de l'enzyme, ce qui, dans les cultures en présence d'un mélange de glucose et de L-lactate, se traduit par une croissance diauxique dont le déterminisme est ici de type classique.

L'existence de deux LDH oxydatives et d'une seule pyruvate-réductase conduisant à la formation de D-lactate a été retrouvée chez Aerobacter cloacae et chez toutes les autres Entérobactéries que nous avons étudiées, appartenant aux genres Proteus, Serratia, Escherichia, Citrobacter, Klebsiella, Hafnia et Salmonella. Physiologiquement, la possession de ces trois enzymes assure complètement un métabolisme normal dans toutes les conditions de culture. En effet, si deux enzymes oxydatifs sont nécessaires pour la croissance sur D- et L-lactate, une seule pyruvate-réductase suffit pour assurer, en anaérobiose, la réoxydation du $NADH_2$ provenant de la fermentation des sucres.

Dans la dernière partie de ce travail, nous avons utilisé Micrococcus denitrificans. Cet organisme, dépourvu de véritable métabolisme fermentaire, ne se développe en anaérobiose qu'en présence d'un accepteur d'électrons exogène, tel que le nitrate ; il ne forme donc pas d'acide lactique. Par contre, il est capable d'utiliser les deux isomères du lactate comme sources de carbone et d'énergie, en aérobiose comme en anaérobiose.

Nous avons caractérisé chez M. denitrificans deux LDH oxydatives stéréospécifiques. Ces enzymes, contrairement à ceux d'A. aerogenes sont couplés au cytochrome c de muscle cardiaque et sont tous deux inhibés par l'oxalate. La biosynthèse de la D- et de la L-LDH ne semble soumise à aucune régulation : les deux enzymes sont formés en aérobiose comme en anaérobiose, en présence comme en l'absence de lactate. D'autre part, dans les cultures aérobies sur un mé-

lange de D- ou L-lactate et de glucose, on n'observe pas d'utilisation préférentielle de ce dernier et, par conséquent, pas de répression ni d'inhibition des LDH par le glucose.

La multiplicité des enzymes microbiens qui participent au métabolisme de l'acide lactique, leur spécialisation fonctionnelle, oxydative pour les uns, biosynthétique pour les autres, la complexité de leur régulation et ses variations d'un organisme à l'autre sont des constatations intéressantes, mais dont la signification physiologique est encore obscure. L'acide lactique, comme l'acide pyruvique, constitue un des principaux carrefours des voies métaboliques. En outre, chez les bactéries, le lactate entre la constitution de la paroi cellulaire et sa synthèse est, de ce fait, indispensable à la vie. Il est possible que ces fonctions multiples expliquent la multiplicité des enzymes et la complexité de leur régulation, mais dans l'état actuel des connaissances, il serait prématuré de tirer, à ce sujet, des conclusions précises.

Vu, Marseille, le 7 Mars 1966

Le Doyen

P. PROUARD

Vu et permis d'imprimer,
Aix-en-Provence, le

Le Recteur

P. GUILLON

BIBLIOGRAPHIE

Altermatt, H.A., Simpson, F.J. et Neish, A.C., 1955, Can. J. Microbiol., 1, 473.

Anderson, A.A. et Greaves, J.E., 1942, Ind. Eng. Chem., 34, 1522.

Appleby, C.A. et Morton, R.K., 1954, Nature, 173, 749.

Appleby, C.A. et Morton, R.K., 1959, Biochem. J. 73, 539.

Bach, S.J., Dixon, M. et Zerfas, L.J., 1946, Biochem. J. 40, 229.

Barker, S.B. et Summerson, W.H., 1941, J. Biol. Chem., 138, 535.

Baudras, A., Iwatsubo, M. et Labeyrie, F., 1960, Comptes Rendus, 250, 2621.

Beers, R.F., 1957, Nature, 180, 248.

Bernath, P. et Singer, T.P., 1962, dans "Methods in Enzymology" (Colowick, S.P. S.P. et Kaplan, N.O., Eds) Vol. V, p. 597, Academic Press, New York.

Boeri, E., Gremona, T. et Singer, T.P., 1960, Biochem. Biophys. Res. Commun, 2, 298

Breed, R.S., Murray, E.G.D. et Hitchens, 1948, "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", Williams et Wilkins, Baltimore, Maryland.

Brin, M., Olson, R.E et Stare, F.J., 1952, Arch Biochem. Biophys., 39, 214.

Chin, C H., 1950, Nature, 165, 926.

Christensen, W.B., Johnson, M.J. et Peterson, W.H., 1939, J. Biol. Chem. 127, 421

Curdel, A., Naslin, L. et Labeyrie, F, 1959, Comptes Rendus, 249, 1959

Dagley, S. et Dawes, E.A, 1953 a, Nature, 172, 345

Dagley, S. et Dawes, E.A., 1953 b, J. Bacteriol., 66, 259.

De Ley, J. et Schel, J., 1959, Biochim. Biophys. Acta, 35, 154.

Dennis, D. et Kaplan, N.O., 1960, J. Biol. Chem., 235, 810.

Dennis, D., 1962, dans "Methods in Enzymology" (Colowicks, S P. et Kaplan, N.O. Eds), Vol. V, p. 226, Academic Press, New York.

Dennis, D. et Kaplan, N.O., 1963, Biochem. Z., 338, 485.

Dickman, S.R. et Ring, B., 1958, J. Biol. Chem., 231, 741.

El Hawary, M.F.S. et Thompson, R.H.S., 1953, Biochem J., 53, 340.

Englesberg, E., Gibor A. et Levy, J.B., 1954 a, J. Bacteriol., 68, 146.

Englesberg, E., Levy, J.B. et Gibor, A., 1954 b, J. Bacteriol., 68, 178.

Englesberg, E. et Levy, J.B., 1955, J. Bacteriol., 69, 418.

Ephrussi, B. et Slonimski, P.P., 1950, Comptes Rendus, 230, 685.

Forget, P. et Pichinoty, F., 1964, Biochim. Biophys. Acta, 82, 441.

Fred, E B., Peterson, W.H. et Stiles, H.R., 1925, J. Bacteriol, 10, 63.

Gregolin, C., Singer, T.P. et Kearney, E.B., 1961, Ann. N.Y. Acad. Sci., 94, 780.

Gregolin, C. et Singer, T.P., 1963, Biochim. Biophys Acta, 67, 201.

Iwatsubo, M. et Curdel A. 1962. Biochim Biophys Res Commun., 6, 385
Jacob F. et Monod, J., 1961, J. Mol. Biol., 3, 318.
Juni, E., 1952. J. Biol. Chem., 195, 715
Kamen, M.D. et Vernon, L.P., 1955, Biochim Biophys. Acta, 17, 10
Kaplan, N.O. et Ciotti, M.M., 1965 a, J. Biol. Chem., 221, 823
Kaplan, N.O. et Ciotti, M.M., 1956 b, J. Biol. Chem, 221, 833.
Kattermann, R. et Slonimski, P.P. 1960, Comptes Rendus, 250, 220.
Kaufmann, E. et Dikstein, S., 1961, Nature, 190, 346.
Kearney, E.B. et Singer, T.P., 1956, J. Biol. Chem., 219, 963.
Klyne, E.S. et Mahler, H.R., 1965; Ann. N.Y. Acad. Sci., 119, 905.
Labeyrie, F., Slonimski, P.P. et Naslin, L., 1959, Biochim. Biophys. Acta, 34, 262
Labeyrie, F. et Slonimski, P.P., 1964, Bull Soc. Chim. Biol., 46, 1793.
Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Far, AL. et Randall, R.J., 1951, J. Biol. Chem., 193, 265.
Magasanik B., 1961 Cold Spring Harbor Symp. Quant' Biol 26, 249.
Mandelstam, J., 1961, Biochem, J., 79, 489.
Mandelstam, J., 1962, Biochem. J, 82, 489.
Martin, C.J. et Axelrod, A.E., 1958, Biochim. Biophys Acta, 27, 52.
Matsushima, Y. et Park, J.T., 1961, Federation Proc., 20, 78.
Molinari, R. et Lara, F.J.S., 1960, Biochem. J., 75, 57.
Monod, J., 1942 Recherches sur la croissance des cultures bactériennes, Hermann, Paris
Monod, J., Changeux, J.P. et Jacob, F., 1963, J. Mol. Biol., 6, 306.
Neidhart, F.C et Magasanik, B., 1956, Nature, 178, 801.
Neish, A.C. et Blackwood, A.C., 1951, Can. J. Technol., 29, 123
Nygaard, A.P., 1960, Biochim Biophys. Acta, 40, 85.
Nygaard, A.P., 1961 a, J. Biol. Chem., 236, 920
Nygaard, A.P., 1961 b, J. Biol Chem., 236, 1585.
Okuniki K B., Hagihara, I Sekuzu, I. et Horio, T., 1958. Proceedings of the International Symposium on Enzyme Chemistry, Tokyo et Kyoto, p 264 Maruzen, Tokyo
Orla-Jensen, 1919, Kgl Danske Videnskab Selskabs Skrifter, Naturvidenskab math. Afdel (8) 5, 51.
Osburn, O.L., Brown, R.W. et Werkman, C.H., 1937, J. Biol. Chem., 121, 685
Park, J.J. et Johnson, M.J., 1949 J Biol. Chem., 16, 515.
Pascal, M.C. et Pichinoty, F., 1963, Biochim. Biophys. Acta, 77, 507.
Pascal, M.C et Pichinoty, F., 1964, Bull. Soc. Chim. Biol., 46, 1175.
Pederson, C.S. et Breed, R.S., 1928, J. Bacteriol, 16, 163.
Pederson, C.S., 1929, N.Y. State Agr. Expt. Sta. Tech. Bull., 151
Pederson, C.S., 1949, Bacteriol. Revs., 13, 225
Pichinoty, F., 1963, Enzymologia, 26, 176.

Pichinoty, F., 1965, Colloque Intern. Centre Natl. Rech. Sci. (Paris) 124, 507.
Pine, L., Haas, V. et Barker, H.A., 1954, J. Bacteriol., 68, 227.
Simon, E., 1947, Arch. Biochem., 13, 237.
Singer, T.P. et Kearney, E.B., 1957, Methods of Biochem. Anal., 4, 307.
Singer, T.P., Kearney, E.B., Gregolin, C., Boeri, E. et Rippa, M., 1960, Biochem. Biophys. Res. Commun., 3, 428.
Singer, T.P., Kearney, E.B., Gregolin, C., Boeri, E. et Rippa, M., 1961; Biochim. Biophys. Acta, 54, 52.
Slonimski, P.P., 1956, proc. 3rd Intern. Congr. Biochem., p. 242, Academic Press, New York.
Slonimski, P.P. et Tysarowski, W., 1958, Comptes Rendus, 246, 111.
Slonimski, P.P., Acher, R., Péré, G., Sels, A. et Somlo, M., 1965, Colloque Intern. Centre Natl. Rech. Sci. (Paris) 124, 435.
Smith, L., 1954, Bacteriol. Revs., 18, 106.
Snoswell, A.M., 1963, Biochim. Biophys. Acta, 77, 7.
Somlo, M., 1962, Biochim. Biophys. Acta, 65, 333.
Somlo, M., 1965, Biochim. Biophys. Acta, 97, 183.
Strange, R.E. et Kent, L.H., 1959, Biochem. J., 71, 333.
Sutton, W.B., 1957, J. Biol. Chem., 226, 395.
Tabeke, I., Shirakawa, T. et Kitihara, K., 1963, Koso Kagaku Shimposium, 15, 162.
Tatum, E.L. et Peterson, W.H., 1935, Ind. Eng. Chem., 27, 1493.
Umbreit, W.W., Burris, R.H. et Stauffer, J.F., 1957, "Manometric Techniques" p. 239, Burgess Publishing Company, Minneapolis.
Vernon, L.P. et White, F.G., 1957, Biochim. Biophys. Acta, 25, 321.
Walker, H. et Eagon, R.G., 1964, J. Bacteriol., 88, 25.
Warburg, O. et Christian, W., 1938, Biochem. Z., 298, 150.
Weidel, von W. et Primosingh, J., 1957, Z. Naturf., 12, 441.
Wittenberger, C.L. et Haaf, A.S., 1964, J. Bacteriol., 88, 896.
Yamamura, Y., Kusunose, M. et Kusunose, E., 1952, Nature, 170, 207.
Yoshida, A., 1965, Biochim. Biophys. Acta 99, 66.

DEUXIEME THESE

propositions données par la faculté